

Pemeriksaan *Tilapia Lake Virus* (TiLV) Pada Komoditas Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Tilapia Lake Virus (TiLV) Examination on Commodities of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Nadiatul Husna¹, Hapsari Kencono^{2*}, Mohammad Faizal Ulkhaq², Arif Habib Fasya², Dwi Lantiani³

¹Program studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, PSDKU Universitas Airlangga di Banyuwangi, Jl. Wijaya Kusuma No. 133, Banyuwangi 68425, Indonesia

²Dosen Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga PSDKU Banyuwangi. Jl. Wijaya Kusuma No. 133, Banyuwangi 68425, Indonesia

³Stasiun Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Yogyakarta

*Email: nadiatul.husna-2017@fpk.unair.ac.id

Submitted: 3 Juli 2020

Revised: 8 September 2020

Accepted: 18 September 2020

Abstrak

Pemanfaatan potensi komoditas perikanan dan lalu lintas komoditas perikanan baik antar negara maupun antar area di wilayah Indonesia yang semakin meningkat, menjadi peluang akan risiko masuk dan tersebarnya hama dan penyakit ikan. Salah satu patogen yang bersifat akut yang dapat menyebabkan kerugian besar adalah virus. Virus yang sering menyerang ikan air tawar yaitu *Tilapia Lake Virus* (TiLV). Pemeriksaan virus menggunakan metode PCR konvensional, dimulai dengan nekropsi, fiksasi, ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, dan pembacaan hasil. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi adanya infeksi TiLV pada komoditas ikan air tawar menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini dilaksanakan pada 23 Desember 2019 - 27 Januari 2020 di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Yogyakarta. Sampel yang diperiksa yaitu ikan nila sejumlah 14 sampel. Berdasarkan hasil uji ditemukan 2 sampel positif mengandung RNA TiLV yang terlihat adanya pita (*band*) pada panjang 250 bp (*base pairs*) pada benih ikan nila.

Kata Kunci: Komoditas ikan nila, Metode PCR, TiLV.

Abstract

The increasing utilization of the potential for fishery commodities and the traffic of fishery commodities between countries and between areas in the Indonesian territory is an opportunity for the risk of entry and spread of fish pests and diseases. One of the pathogens that are acute in nature that can cause great harm is a virus. The virus that often attacks freshwater fish is the *Tilapia Lake Virus* (TiLV). Virus examination using conventional PCR methods, starting with necropsy, fixation, extraction, amplification, electrophoresis, and reading the results. The aim of this study was to detect the presence of TiLV infection in freshwater fish commodities using the *Polymerase Chain Reaction* PCR method. This research was conducted on 23 December 2019-27 January 2020 at the Fish Quarantine Station for Quality Control and Safety of Fishery Products in Yogyakarta. The samples examined were 14 samples of tilapia. Based on the test results, it was found that 2 positive samples contained TiLV RNA which showed a band at 250 bp length (*base pairs*) in tilapia seeds.

Keywords: Tilapia Commodity, PCR method, TiLV.

PENDAHULUAN

Produksi perikanan budidaya pada tahun 2017 mencapai 17,22 juta ton, hal ini berbanding lurus dengan peningkatan konsumsi ikan sejak tahun 2014 hingga 2017 yang mencapai 21,9% (KKP, 2017). Budidaya ikan air tawar merupakan salah satu komoditas yang mengalami peningkatan produksi. Menurut Kementerian Perikanan dan Kelautan (2018), produksi unggulan pada budidaya ikan air tawar terus mengalami peningkatan sejak tahun 2012. Lebih lanjut, kegiatan ekspor – impor komoditas ikan air tawar setiap tahunnya juga mengalami peningkatan.

Berdasarkan pusat data statistik Kementerian Perikanan dan Kelautan (2015), nilai total impor pada tahun 2013 sampai dengan 2014 meningkat dari 2.912 hingga mencapai 9.712, sedangkan nilai total ekspor pada tahun 2013 sampai dengan 2014 meningkat dari 11.775.634 hingga mencapai 1.793.170. Meningkatnya nilai total ekspor hasil perikanan dapat disebabkan adanya kegiatan ekspor hasil perikanan di Indonesia menuju ke berbagai Negara tujuan telah berkembang pesat.

Komoditas budidaya ikan air tawar yang menjadi potensi unggulan dalam negeri, yaitu ikan lele, mas, nila, patin, gurame (Nugroho dkk, 2017).

Pemanfaatan potensi komoditas perikanan di Indonesia dan lalu lintas komoditas perikanan baik antar negara maupun antar area di dalam wilayah Negara Republik Indonesia yang semakin meningkat, menjadi peluang akan peningkatan risiko masuk dan tersebarnya hama dan penyakit ikan baik dari dalam maupun luar negeri (Sumber: No. 99/KEP-BKIPM/2017). Aktifitas perdagangan bebas yang terus meningkat berbanding lurus dengan potensi serangan penyakit ikan.

Berbagai jenis serangan penyakit ikan dapat disebabkan oleh adanya patogen, seperti virus. Infeksi virus yang bersifat akut dan menyebabkan kerugian yang besar dalam waktu singkat (Nagasawa and Cruz - lazierda. 2004). Salah satu virus yang dapat menyerang ikan air tawar dan menyebabkan kerugian besar dalam kegiatan budidaya adalah *Tilapia Lake Virus* (TiLV) (Koesharyani dkk, 2018).

Tilapia Lake Virus (TiLV) dilaporkan telah menyerang beberapa negara, seperti Israel, Ekuador, Kolombia, Thailand, dan Mesir (Tsofack *et al.*, 2016). Menurut Koesharyani dkk (2018), TiLV telah menyerang ikan nila di wilayah Lombok. Penularan penyakit TiLV dapat melalui ikan yang telah terinfeksi ke ikan yang sehat melalui media air dalam waktu 2-3 hari, dimana tingkat kematian mencapai 50% (Eyngor *et al.*, 2014). Penyakit ini aktif menyerang ikan pada suhu perairan $> 25^{\circ}\text{C}$ dan puncak kematian massal pada suhu 30°C (Tsofack *et al.*, 2016).

TiLV merupakan salah satu jenis virus yang masuk kedalam HPIK gol I (Sumber: No.108/KEP-BKIPM/2017), sehingga berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut untuk mengetahui adanya serangan TiLV pada ikan nila. Tujuan dari penelitian adalah untuk mendeteksi adanya infeksi TiLV pada komoditas ikan air tawar dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik pemeriksaan virus menggunakan metode PCR konvensional

yang dimulai dari penerimaan dan pendataan sampel, nekropsi, fiksasi, ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis, dan pembacaan hasil.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada 23 Desember 2019 sampai dengan 27 Januari 2020, di Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan, Yogyakarta.

Persiapan Alat

Peralatan yang digunakan untuk identifikasi disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf. Alat PCR yang digunakan adalah sentrifuge merk *dynamica*, microwave, microtube 1,5 ml dan 0,2 ml, mikrotipe, vortex merk *biosan*, mikropipet, *thermal cycler* merk *sensoquest*, *drybath Incubator*, cetakan agar, *filter tube* dan *tube collection* merk *high pure* RNA kit, dan lemari laminar. Selanjutnya, dalam pembacaan hasil menggunakan elektroforesis unit dan UV Transluminator.

Nekropsi

Nekropsi merupakan proses pembedahan sampel untuk mengambil organ yang sesuai dengan jenis uji yang

akan dilakukan (Ramlah dkk., 2016). Pada penelitian ini sampel yang digunakan, yaitu ikan nila. Sebelum melakukan nekropsis sampel, dilakukan pengukuran panjang dan berat ikan. Pengukuran panjang dan berat sampel dapat digunakan untuk menentukan organ target yang akan diuji (No. 32/KEP-BKIPM/2015). Organ target yang diambil untuk pemeriksaan virus TiLV adalah yaitu otak, mata, ginjal, limpha, dan hati (No. 73/KEP-BKIPM/2017).

Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk mempertahankan struktur sel dan jaringan agar tidak terjadi kerusakan paska kematian (No. 73/KEP-BKIPM/2017). Fiksasi sampel dilakukan dengan perendaman sampel menggunakan larutan ethanol 96%. Larutan ethanol akan langsung meresap dan mengawetkan DNA yang terdapat di dalam sel dengan cepat, sehingga kualitas DNA dapat terjaga dengan baik (Marwayana, 2015).

Ekstraksi RNA TiLV

Proses ekstraksi bertujuan untuk memisahkan asam nukleat dengan komponen sel lain (Fitriatin dan Abdul, 2015), seperti protein dan selulosa, serta

pemurnian materi genetik (Langga, 2012). Proses ekstraksi RNA yang dilakukan menggunakan test kit *High Pure Viral Kit*. Proses ekstraksi RNA dimulai dengan pengambilan sampel organ sebanyak ± 20 -25 mg, penambahan larutan 400 μ l *lysis/binding buffer* dan dihancurkan menggunakan *paste*. Penambahan Dnase 4 μ l kemudian dihaluskan menggunakan *paste*. DNase digunakan untuk mendegradasi DNA sehingga hanya RNA yang tertinggal, selanjutnya sampel diinkubasi selama 15 menit pada suhu 15-25°C dan disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit.

Hasil dari sentrifuge diperoleh supernatan yang mengandung RNA (Pranawaty dkk., 2012). Supernatan yang mengandung RNA dipindahkan kedalam filter tube yang dikombinasikan dengan *tube collection* kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Penambahan 500 μ l *inhibitor removal buffer* kemudian dsentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Proses selanjutnya, penambahan 450 μ l *wash buffer* pada *filter Tube*

kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.

Proses pencucian ini dilakukan sebanyak dua kali. Selanjutnya, ditambahkan 100 μ l *elution buffer* kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Hasil ekstraksi RNA dapat dilanjutkan tahap amplifikasi. Selain itu, hasil ekstraksi juga dapat disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20°C. Penyimpanan ekstraksi RNA dapat bertahan dalam jangka waktu 2 bulan, hal ini karena lama waktu penyimpanan menyebabkan penurunan kestabilan RNA (Novita dkk., 2009).

Amplifikasi RNA TiLV

RNA dari jaringan ikan yang telah diekstraksi, akan dilakukan pengujian TiLV menggunakan PCR. Tahap amplifikasi TiLV dilakukan secara *double step* dengan menggunakan RNA kit. *Step* pertama pada amplifikasi TiLV menggunakan primer Ext-1 (10 μ M) 5'-TAT-GCA-GTA-CTT-TCC-CTG-CC-3' dan Primer Me 1 (10 μ M) 5'-GTT-GGG-CAC-AAG-GCA-TCC-TA-3' (IKM, 2019). Komposisi reaksi PCR menggunakan 2x Promega Go Taq Green PCR *master Mix* 12,5 μ l; *Enzyme Reverse*

Transcriptase AMV 0,5 μ l; *Nuclease Free Water* 8 μ l; primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1 μ l, dan RNA *template* hasil ekstraksi 2,5 μ l. *Master mix* dan RNA *template* akan digabung dalam tube 0,2 ml.

Selanjutnya, dilakukan uji PCR menggunakan *Thermal Cycler* dengan parameter siklusnya: *Reverse transcription* 50°C selama 30 menit, *Pre denaturasi* 94°C selama 2 menit, *denaturasi* 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *ekstension* 72°C selama 30 detik, *final ekstension* 72°C selama 7 menit.

Nested PCR

RNA hasil amplifikasi PCR *step-1* sebanyak 2,5 μ l digunakan sebagai *template* untuk *nested* PCR dengan target band 250 bp. Primer yang digunakan pada *step-2*, yaitu Primer Me 2 (10 μ M) 5'-TAT-CAC-GTG-CGT-ACT-CGT-TCA-GT-3' dan Primer Me 1 (10 μ M) 5'-GTT-GGG-CAC-AAG-GCA-TCC-TA-3'.

Komposisi reaksi PCR menggunakan 2x Promega Go Taq Green PCR *master Mix* 12,5 μ l; *Nuclease Free Water* 8 μ l; primer *forward* dan *reverse*

masing-masing 1 μ l, dan RNA template 2,5 μ l. *Master mix* dan *RNA template* akan digabung dalam tube 0,2 ml. Selanjutnya, akan dilakukan uji PCR menggunakan *Thermal Cycler* dengan parameter siklusnya: *Reverse transcription* 50°C selama 30 menit, Pre denaturasi 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *ekstension* 72°C selama 30 detik, *final ekstension* 72°C selama 7 menit (IKM, 2019).

Elektroforesis

Elektroforesis digunakan untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran (berat molekul) dan struktur molekulnya. Semakin kecil molekul DNA maka migrasi molekul DNA melewati gel akan semakin cepat (Kurniawati dkk, 2019). Proses elektroforesis dilakukan dengan meletakkan gel agarose beserta baki gel ke dalam alat elektroforesis (tangki elektroforesis) dengan posisi sumuran ada di kutub negatif. *TAE buffer* 1x

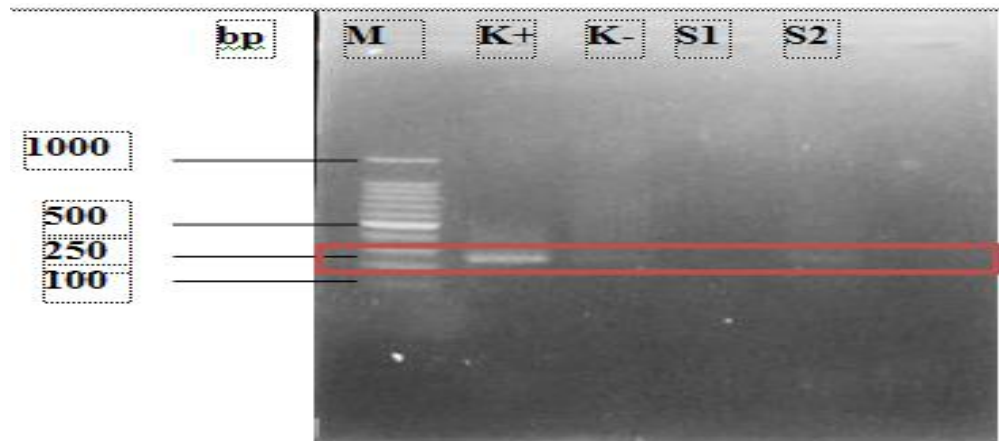
ditambahkan sampai menutupi sumuran pada gel. Reagen seperti marker, kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel sebanyak 5 μ l dimasukkan ke dalam sumuran, kemudian di elektroforesis.

Marker yang digunakan untuk proses elektroforesis, yaitu marker 100 bp dan arus 110 volt selama 30 menit. Namun, pada penggunaan arus 100 volt proses elektroforesis berlangsung selama 40 menit (Utami dkk, 2013). Pembacaan hasil elektroforesi dilakukan dengan bantuan *UV Transluminator* yang terhubung langsung dengan kamera dan laptop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan TiLV

Berdasarkan hasil elektroforesis pita RNA TiLV hanya terlihat sangat tipis pada 250 bp. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi RNA yang diperoleh sangat sedikit sehingga tidak begitu jelas (terlihat tipis) saat divisualisasikan pada agarose (Staats *et al*, 2011). Hasil pengujian dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil pembacaanelektroforesis virus TiLV.(Keterangan : M = Marker 100 bp, K+ = Kontrolpositif,K-= Kontrolnegatif, S1 =Sampel 1 (NegatifTiLV), S2 = Sampel 2 (PsitifTiLV))

Berdasarkan hasil pemeriksaan ditemukan dua sampel dari empat belas sampel yang teridentifikasi adanya infeksi TiLV pada benih ikan nila. *Tilapia Like Virus* merupakan virus yang sering menyerang ikan dari empat belas sampel yang teridentifikasi adanya infeksi TiLV pada benih ikan *Tilapia Like Virus* merupakan virus yang sering menyerang ikan dari golongan Tilapia, seperti ikan nila *Sarotherodon (Tilapia) liargalilaeus*,

tilapia budidaya *Oreochromis niloticus* dan ikan nila hibrida komersial (*O. niloticus X O. aureus*) (Bacharach et al., 2016; Ferguson et al., 2014; Eyngor et al., 2014). Koesharyani dkk, (2018) juga menyatakan, TiLV dapat menyerang ikan nila. Hal ini membuktikan bahwa ikan nila rentan terserang TiLV. Berikut merupakan hasil uji identifikasi TiLV pada sampel ikan yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel hasil uji identifikasi TiLV pada sampel ikan

No.	Jenis dan No Sampel	Parameter Uji	Hasil Uji
1.	Benih ikan nila (1,6,8,9,10,11,12,13,14)	TiLV	-
2.	Ikan nila (2,3,7)	TiLV	-
4.	Larva nila (4,5)	TiLV	-

Keterangan: (-): hasil uji negatif

Berdasarkan hasil penelitian pada benih nila ditemukan adanya

infeksi TiLV. Virus TiLV dapat dengan mudah menyerang ikan stadia benih

karena pada stadia benih sistem imun pada tubuh ikan belum berkembang secara sempurna. Hal ini sesuai dengan pendapat Tatang, (2014) pada fase benih organ-organ yang berperan dalam sistem pembentukan antibodi masih belum sempurna, sehingga benih nila mudah terserang penyakit. Pertahanan umum pada benih hanya bersifat pertahanan non spesifik, sehingga apabila terdapat serangan virus maka sistem imun belum bisa melawan virus yang masuk (Ode, 2013). Ikan yang terinfeksi virus dapat menyebabkan penularan penyakit terhadap ikan yang lain. Ikan yang dalam kondisi stress akan lebih rentan terserang penyakit (Mustahal dkk, 2006).

Gejala klinis infeksi TiLV berupa letargi, tubuh menghitam, endophtalmis, erosi kulit, kongesti pada ginjal, degenerasi ocular dan encephalitis (Bacharach *et al.*, 2016). Perubahan secara makroskopis ikan yang terinfeksi TiLV adalah warna kulit tubuh gelap atau menghitam, adanya luka pada kulit, pembengkakan rongga perut, mata mengalami exophtalmia dan buram atau katarak (Koesharyani dkk, 2018). Namun, pada ikan sampel penelitian tidak terlihat

adanya kerusakan fisik, hanya menunjukkan perubahan tingkah laku, seperti pergerakan tidak aktif dan lamban. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Dong *et al.*, (2017a) gejala klinis infeksi TiLV di Thailand pada ikan nila ditandai dengan nafsu makan menurun, warna tubuh menjadi pucat, berkelompok di dasar bak, pergerakan lamban, tidak aktif, dan pada akhirnya mengalami mortalitas.

Penularan penyakit TiLV dapat melalui ikan yang telah terinfeksi ke ikan yang sehat melalui media air dalam 2 - 3 hari dengan tingkat kematian mencapai 50 % (Eyngor *et al.*, 2014). Penyakit ini banyak menyerang ikan pada suhu diatas 25°C dan puncak kematian missal pada suhu 30°C (Tsofack *et al.*, 2016). Penyakit ini banyak menyerang ikan pada suhu diatas 25°C dan puncak kematian missal pada suhu 30°C (Tsofack *et al.*, 2016).

Ikan uji pada penelitian ini dipelihara menggunakan sistem budidaya semi intensif dengan padat tebar tinggi. Faktor timbulnya wabah penyakit TiLV adalah suhu air dan kepadatan tinggi (No.73/KEP-BKIPM/2017). Suhu air yang menyebabkan wabah, yaitu pada

suhu >25°C, sedangkan suhu yang tidak menyebabkan kematian adalah dibawah 20°C, dan puncak kematian masal terjadi pada suhu 30°C (Tsofack *et al.*, 2016). Menurut Mugimba *et al.*, (2018) TiLV tumbuh optimum pada suhu 28°C, sehingga pada suhu >25°C dapat menunjang TiLV untuk bereplikasi dan mempercepat infeksi pada inang.

Kepadatan tinggi juga memicu timbulnya wabah penyakit TiLV. Hal ini karena padat tebar tinggi berisiko terhadap tingkat ketahanan hidup dan kerusakan fisik berupa luka pada kulit yang muncul akibat gesekan antar ikan dengan wadahnya (Suwandi dkk. 2013). Luka pada kulit merupakan penyebab utama terjadinya penularan infeksi. Ikan yang terluka akan memiliki daya imun yang rendah dari ikan sehat sehingga penyakit lebih mudah menyerang (BKIPM Merauke, 2018). Selain itu, TiLV dapat menyerang secara horizontal, sehingga apabila padat tebar pada kolam tinggi maka penularan pada ikan semakin cepat (No.108/KEP-BKIPM/2017).

KESIMPULAN

Hasil penelitian pemeriksaan virus pada sampel komoditas ikan air tawar

menggunakan metode PCR ditemukan adanya RNA TiLV pada sampel benih ikan nila. Berdasarkan hasil elektroforesis pita RNA TiLV muncul pada 250 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti, Y. dan S. Sianturi. 2019. Ekstraksi DNA Total dari Sumber jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode *Kit for Animal Tissue*. *Journal of Science and Applicative Technology*, 3(1): 40-45.
- Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Zody, M.C., Kembou Tsofack, J.E., Zamostiano, Lipkin, W. I., Kabuusu, R. M., Ferguson. 2016. Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. *mBIO*, 7(2): e00431-16.
- Dong, H.T., Siriroo, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Khunrae, K., & Senapin, S. 2017a. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*, 476, 111-118.
- Eyngor, M., zamostiano, R. tsofack, J. E. K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinmas, S., Lev, M., Huryitz, A., Galeotti, M., Eldar, A. 2014. Identification of a Noval RNA Virus Lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (12): 4137-4146.
- Fitratunisa. 2016. Inventarisasi Penyakit Bakteri dan Virus pada Benih Ikan Kakap Putih *Lates calcarifer*, Bloch 1790 di Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor: Bogor: 1-16.
- Handoyo, D., dan A. Rudiretna. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1): 17-29.
- Iqbal, M., I. D., Buwono, dan N. Kurniawati. 2016. Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA untuk Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada udang

- Vanname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Perikanan Kelautan*, 8 (1): 54-65.
- Kamaliah. 2017. Perbandingan Metode ekstraksi DNA *Phenol-Chloroform* dan *Kit Extraction* pada Sapi Aceh dan Sapi Madura. *Jurnal Biotik*, 5(1): 60-65.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2017. Produktivitas perikanan Indonesia pada: Forum Merdeka Barat 9 Kementerian komunikasi dan Informatika. Jakarta, 19 Januari 2018. 49 hlm.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan. 2018. Laporan pemantauan Penyakit Ikan Karantina. Merauke, September 2018. 103 hlm.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. Refleksi dan Outlook. Jakarta, 17 Desember 2018. 67 hlm.
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 99/Kep-Bkipm/2017 Tentang Kategorisasi Tingkat Risiko Media Pembawa Hama dan Penyakit Ikan Karantina dan/ Atau Hama dan Penyakit Ikan Tertentu Serta Produk Lainnya.
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 32/Kep-Bkipm/2015 Tentang Petunjuk Teknis Pemantauan Hama dan Penyakit Ikan Karantina.
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 99/Kep-Bkipm/2017 Tentang Kategorisasi Tingkat Risiko Media Pembawa Hama dan Penyakit Ikan Karantina Dan/Atau Hama Dan Penyakit Ikan Tertentu Serta Produk Lainnya.
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 108/Kep-Bkipm/2017 tentang Analisis Risiko Penyakit *Tilapia Lake Virus* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*).
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 73/Kep-Bkipm/2017 tentang Petunjuk Teknik Surveilans Penyakit *Tilapia Lake Virus*.
- Perikanan Nomor 108/Kep-Bkipm/2017 tentang Analisis Risiko Penyakit *Tilapia Lake Virus* Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*).
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 73/Kep-Bkipm/2017 tentang Petunjuk Teknik Surveilans Penyakit *Tilapia Lake Virus*.
- Koesharyani, I., L. Gardenia, Z. Widowati, Khumaira, dan D. Rustianti. 2018. Studi Kasus Infeksi *Tilapia Lake Virus* (TiLV) pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1): 85-92.
- Kurniawati, M. D., Sumaryam, dan N. Hayati. 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 Techno-Fish*, 3(1): 19-30.
- Langga, I. F., M. Restu, dan T. Kuswinanti. 2012. Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex Cofasus Reinw*) serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 12(3): 265-267.
- Marwayana, O. N. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *Oseana*, 11 (2): 1-9.
- Muhsinin, S., M. M. Sulastri, dan D. Supriadi. 2018. Deteksi Cepat Gen *InvA* pada *Salmonella* spp. Dengan Metode PCR. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 5(3): 19 - 200.
- Mustahal, Manijo, dan C. Kirana. 2006. Pengujian Penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) pada Beberapa Ikan Budidaya. *Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan perikanan Indonesia*, 13(1): 21-26.
- Nagasawa, K., Cruz-Lacierda, E.R (eds.). 2004. Diseases of cultured groupers. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Iloilo, Philippines. 81 p.
- Novita, H., T. Mufidah, dan I. Koesharyani. 2009. Perbandingan penggunaan Berbagai Preservasi RNA Jaringan dengan RNA Later, Alkohol, dan Alkohol Gliserol untuk

- Deteksi IMNV dengan PCR. *Jurnal Ris. Akuakultur*, 4 (3): 377-383.
- Nugroho, B.D., H. Hardjomidjojo, dan M. Sarma. 2017. Strategi Pengembangan Usaha Budidaya Ikan Konsumsi Air Tawar dan Ikan Hias Air Tawar pada Kelompok Mitra Posikandu kabupaten Bogor. *Journal IPB Manajemen IKM*, 12(2): 1-10.
- Ode, I. 2013. Kajian Sistem Imunitas untuk Pengendalian Penyakit pada Ikan dan Udang. *Jurnal Ilmiah agribisnis dan perikanan*, 6 (2): 41-43.
- Office International des Epizooties (OIE). 2009. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animal. 4th Edition. Office International Des Epizooties. France. 159-167.
- Pranawaty, R. N., Ibnu, D. B., dan Evi, L. 2012. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan *Real Time PCR* untuk Detek d i *White Spot Syndrome Virus* pada Kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 3(4): 61-74.
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metode elektroforesis. *Oseana*, 26(1): 25-31.
- Pusat Data Statistik Kementerian Perikanan dan Kelautan. 2015. Kelautan dan Perikanan dalam Angka tahun 2015 :1-340.
- Ramlah, E. Soekendarsi, Z. Hasyim. 2016. Perbandingan Kandungan Giz ilkan Nila *Oreochromis niloticus* Asal Danau Mawang Kabupaten Gowa dan danau Universitas Hasanuddin Kota Makassar.
- Rau, C. H., A. Yudistira, dan H. E. I. Simbala. 2018. Isolasi, IdentifikasisecaraMolekulerMenggunakan Gen rRNA, dan Uji Aktivitas Antibakteri Bakteri Simbion Endofit yang Disolasi dari Alga *Halimeda opuntia*. *Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 7(2): 53-61.
- Sirait, M. 2013. Kajian Pengembangan Perikanan Berbasis Komoditas Unggulan Di Kabupaten Muna. *Jurnal Kelautan*, 6(2): 150-156.
- Septiawan, J. T., A. Nuryanto, H. Pramono, Kusbiyanto, dan P. H. T. Soedibja. 2016. Karakteristik Molekuler Ikan Gurami Soang (*Osphronemus gouramy* Lac.) yang Mati pada Rentang Waktu Berbeda Menggunakan PCR-RFLP Gen *Major Histocompatibility Complex* Kelas II B. *Biosfera*, 33 (2): 92- 101.
- Staats, M., A. Cuenca, J. E. Richardo, R. Vrieling-VaGinkel, G. Petersen, O. Sebeg, and F. T. Bakker. 2011. DNA Da, age in Plant Herbarium Tissue. *PloS ONE*, 6 (12): e28448.
- Suwandi, R., R. Nugraha, dan K. E. Zulfamy. 2013. Aplikasi Ekstrak Daun Jambu Psidium guajava var. pomifera pada Proses Transportasi Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 16(1): 69-78.
- Tatang. 2014. Modul Praktek Vaksinasi Pada Ikan. Loka pemeriksaan penyakit ikan dan lingkungan. Jakarta.
- Tsofack, J. E. k., Zamostiano, R. Watted, s., Berkowitz, E., Mishra, N., Briese, T., Lipkin, W. I., Kabuusu, R. M., Ferguson, H., Del Pozo, j., Eldar, A., and Bacharach, E. 2016. Detection of tilapia lave Virus (TiLV) in Clinical Sample by Culturing and Nested RT-PCR. *Journal Clinical Microbial. JCM*. 1(8):8-16.
- Utami, S. T., D. F. Kusharyati, H. Pramono. 2013. Pemeriksaan Baktei *Leptospira* pada Sampel Darah Manusia Suspect Leptospirosis Mengguakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *Balaba*, 9(2):74-81.
- Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Saintek*, 5(6): 1-6.