

Deteksi Molekuler TiLV (*Tilapia Lake Virus*) Pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dilalulintaskan Di Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I Jawa Timur

Molecular Detection Of TilV (Tilapia Lake Virus) In Tilapia (Oreochromis Niloticus) Trafficked At The Fish Quarantine Center, Quality Control And Safety Of Fish Products Surabaya I, East Java

Ayuda Dyah Nurekawati¹, Indra Sukma Putra^{1*} , Rahmat Noer Soelistyoadi¹

¹Staf Fungsional Balai Karantina Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I
Jl. Raya Bandara Ir. H. Juanda No. 23 Sidoarjo 61254, Indonesia

*E-mail: ahmadisukma14@gmail.com

ABSTRAK

Sebagai salah satu negara penghasil ikan nila terbesar di dunia, Indonesia harus mewaspadaikan dan melakukan antisipasi terhadap kemungkinan masuk dan tersebarnya penyakit TiLV di Indonesia. Lalu lintas perdagangan ikan nila, baik ikan hidup dan/atau ikan mati, antar negara atau antar daerah akan meningkatkan peluang masuk dan tersebarnya penyakit TiLV di Indonesia. Di beberapa daerah seperti Sumatera, Jawa, Bali dan Lombok telah terjadi kasus kematian pada budidaya ikan nila secara massal yang kemungkinan infeksi penyakit TiLV. Metode uji untuk pengujian *Tilapia Lake Virus* (TiLV) adalah Konvensional Nested PCR. Pengambilan contoh uji dalam penelitian *Tilapia Lake Virus* (TiLV) didasarkan pada frekuensi kegiatan lalu lintas ikan nila antar area melalui Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I. Hasil deteksi virus TiLV pada ikan nila di Balai KIPM Surabaya I pada tanggal 1 Januari sampai dengan 30 Juni 2021, diperoleh sebanyak 35 sampel ikan Nila. Sampel tersebut terdiri dari benih ikan nila dan ikan nila dengan hasil setiap sampel disajikan pada lampiran 1. Dari seluruh sampel diperoleh hasil bahwa 35 sampel yang diperiksa ada 1 sampel yang positif TiLV. Adapun untuk sampel ikan nila negatif TiLV maka sertifikat kesehatan ikan dapat diterbitkan dan dapat dilalulintaskan baik domestik maupun ekspor, namun apabila sampel ikan nila positif TiLV maka sertifikat kesehatan ikan tidak dapat diterbitkan dan dilalulintaskan baik domestik maupun ekspor.

Kata Kunci: Lalu lintas Perdagangan Ikan Nila, *Tilapia Lake Virus* (TiLV), *Nested PCR*

ABSTRACT

As one of the largest tilapia producing countries in the world, Indonesia must be vigilant and anticipate the possibility of the entry and spread of TiLV disease in Indonesia. The traffic of tilapia trade, both live fish and/or dead fish, between countries or between regions will increase the chances of the entry and spread of TiLV disease in Indonesia. In several areas, such as Sumatra, Java, Bali and Lombok, there have been cases of death in mass tilapia aquaculture which may have been infected with TiLV. The test method for testing Tilapia Lake Virus (TiLV) is Conventional Nested PCR. The sampling in the Tilapia Lake Virus (TiLV) study was based on the frequency of tilapia traffic activities between areas through the Fish Quarantine Center, Quality Control and Safety of Fishery Products Surabaya I. The results of the detection of TiLV virus in tilapia at Balai KIPM Surabaya I on January 1 to June 30, 2021, obtained as many as 35 samples of Tilapia. The sample consisted of tilapia fish seed and tilapia fish with the results of each sample presented in appendix 1. From all samples examined, it was found that, 1 sample was positive for TiLV. TiLV negative tilapia samples, and fish health certificates can be issued and can be transported both domestically and for export. However, if the tilapia samples is TiLV positive then fish health certificates cannot be issued and trafficked both domestically and export.

Keywords: The traffic of tilapia trade, *Tilapia Lake Virus* (TiLV), Nested PCR

PENDAHULUAN

Indonesia sebagai salah satu negara maritim dengan luas wilayah lautan yang lebih besar dibanding daratan, tentunya memiliki sumber daya ikan yang sangat melimpah, baik itu ikan air laut maupun air tawar. Ditambah dengan kondisi alam Indonesia yang merupakan wilayah tropis dan mempunyai keragaman fisiografis, sangat menguntungkan untuk kegiatan akuakultur. Suhu air yang relative tinggi serta stabil sepanjang tahun memungkinkan kegiatan budidaya dapat berkembang dengan cukup baik (Basyah *et al.*, 2015).

Potensi sumber daya dibidang perikanan sendiri sangat beragam, salah satunya adalah ikan nila. Ikan nila merupakan komoditas perairan darat yang banyak digemari masyarakat, baik lokal maupun mancanegara. Ikan nila dijadikan sebagai sumber protein untuk memenuhi kebutuhan gizi. Upaya untuk memenuhi permintaan pasar ikan nila di Indonesia dilakukan dengan peningkatan dan pengembangan usaha budidaya. Produksi ikan nila pada tahun 2010 sebesar 491.800 ton dan pada tahun 2012 meningkat sebesar 850.000 ton. Kenaikan rata - rata produksi ikan nila selama tahun 2010 - 2014 sebesar

26,36%. Target produksi ikan nila pada tahun 2013 ditingkatkan menjadi 1,1 juta ton (KKP, 2013). Intensifikasi budidaya ikan nila telah menyebabkan munculnya berbagai kendala antara lain timbulnya masalah penyakit ikan yang bersifat patogenik (Utami *et al.*, 2013).

Kegiatan produksi ikan nila terus meningkat dan semakin intensif sehingga muncul beberapa kendala dalam produksi ikan nila, seperti infeksi penyakit. Ikan nila, khususnya di Indonesia, umumnya dibudidayakan di lingkungan terbuka sehingga mudah terpapar oleh patogen. Beberapa penyakit yang sering ditemukan pada ikan nila adalah penyakit Motile Aeromonas Septicaemia (MAS), vibriosis, columnaris, edwardsiellosis, streptococcosis, saprolegniasis, ciliates, dan monogenetic trematodes. Penyakit tersebut disebabkan oleh infeksi bakteri seperti *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium columnae*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, infeksi fungi seperti *Saprolegnia parasitica*, infeksi parasit seperti *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina sp.*, *Dactylogyrus spp.*. Diantara agen penyebab penyakit, infeksi virus merupakan penyakit serius yang dapat menyebabkan kematian akut pada komoditas ikan (Novriadi *et al.*, 2015).

Sebagai salah satu negara penghasil ikan nila terbesar di dunia, Indonesia harus mewaspadaikan dan melakukan antisipasi terhadap kemungkinan

masuk dan tersebarnya penyakit TiLV di Indonesia. Lalu lintas perdagangan ikan nila, baik ikan hidup dan/atau ikan mati, antar negara atau antar daerah akan meningkatkan peluang masuk dan tersebarnya penyakit TiLV di Indonesia. Langkah yang dapat dilakukan untuk mencegah hal tersebut adalah pelarangan importasi ikan nila dari negara yang terinfeksi TiLV. Larangan impor ikan nila dari negara yang terinfeksi TiLV dinyatakan dalam surat edaran No.3975/DJBP/VII/2017 (Kep-BKIPM 2017). Dibeberapa daerah seperti Sumatera, Jawa, Bali dan Lombok telah terjadi kasus kematian pada budidaya ikan nila secara massal yang kemungkinan infeksi penyakit TiLV. Virus ini merupakan genus dari family Orhtomyxoviridae, yang mereplikasi inti sel pada jaringan ikan. Gejala klinis pada kasus kematian ikan nila yaitu adanya perubahan warna pada tubuh dan kerusakan pada mata (Koesharyani *et al.*, 2018).

Tujuan dari pelaksanaan Penelitian ini adalah untuk dapat mempelajari dan mengetahui ikan Nila yang terdeteksi *Tilapia Lake Virus* (TiLV) di Laboratorium Molekuler Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I yang di lalulintaskan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan

Keamanan Hasil Perikanan (Balai KIPM) Surabaya I, Jalan Raya Bandar Udara Ir. H. Juanda No. 23, Sidoarjo, Jawa Timur pada tanggal 1 Januari sampai dengan 30 Juni 2021.

Metode uji untuk pengujian Tilapia Lake Virus (TiLV) adalah Konvensional Nested PCR. Pengambilan contoh uji dalam penelitian Tilapia Lake Virus (TiLV) didasarkan pada frekuensi kegiatan lalu lintas ikan nila antar area melalui Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Surabaya I.

Kegiatan dilaksanakan di Laboratorium Balai KIPM Surabaya I. Jenis kegiatan yang dilakukan yaitu dimulai dari persiapan sampel yang diuji, ekstraksi RNA sampel, Amplifikasi dan Elektroforesis.

Persiapan Sampel yang Diuji

Penanganan sampel uji dimaksudkan untuk menjamin kondisi sampel uji yang akan diuji. Pemberian kode sampel uji nomor atau kode dan indeks pengujian sebelum dilakukan pemeriksaan. Dalam melakukan pengujian untuk pemeriksaan sampel uji sebagai diagnosa awal terlebih dahulu untuk memudahkan proses pemeriksaan yaitu dilakukan dengan mengamati sampel ikan nila secara makroskopis untuk mengetahui adanya kelainan patologis pada tubuh ikan nila. Pada ikan nila diamati tubuh bagian luarnya dimana gejala klinis serangan TiLV ini bisa dilihat dari tubuh ikan menghitam, erosi pada

kulit, pembengkakan rongga perut, mata mengalami pembengkakan dan katarak (Eriawati, 2019). Setelah itu dilakukan pemeriksaan pengambilan organ target untuk uji TiLV pada ikan nila adalah otak dan mata.

Ekstraksi RNA Sampel

Ekstraksi dilakukan untuk memisahkan jaringan dan RNA pada sampel. Organ target tersebut diambil menggunakan *disectio set* dan dimasukkan kedalam 2 buah *microtube* berukuran 1,5 ml yang telah diberi kode sesuai dengan kode sampel. *Microtube* untuk sampel yang akan diekstraksi berisi 20 mg sampel.

Tahap pertama lisis sel secara fisik yaitu dengan menghaluskan sel organ target dengan menggunakan *paste* penggerus sampai benar-benar halus untuk memecah dinding sel dan membran sel. Sampel yang sudah dihaluskan diberi *GT Buffers* sebanyak 900 μ l untuk membantu proses lisis sel dan *nukleous* dapat keluar dari dalam sel. Disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 3 menit untuk memisahkan antara pellet dan *supernatant* yang mengandung *nukleous*.

Tahap kedua yaitu purifikasi, disiapkan *microtube* 1,5 ml baru ditambahkan *silica* sebanyak 40 μ l untuk mengikat DNA. *Supernatant* dipindahkan sebanyak 600 μ l ke *microtube* yang berisi *silica* dan divortex hingga merata kemudian disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak lebih dari 20 detik).

Tahap ketiga, *supernatant* dibuang dan ditambahkan 500 μ l *GT Buffer* untuk mencuci *pellet silica* untuk memperoleh DNA yang lebih murni. Vortex sampai larut dan disentrifuge

dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak lebih dari 20 detik).

Tahap keempat yaitu presipitasi dengan menambahkan alkohol 70% sebanyak 1 ml. Vortex sampai larut dan disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik (tidak lebih dari 20 detik). Semua supernatant dibuang dan dipastikan bahwa alkohol terbuang dengan sempurna agar tidak mempengaruhi hasil PCR.

Tahap kelima yaitu pelarutan dengan menambahkan DEPC ddH₂O sebanyak 400 µl dan divortex sampai larut kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, vortex sampai larut, kemudian disentrifugasi dengan

kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Larutan dari hasil sentrifugasi dipindahkan ke *microtube* 1,5 ml baru.

Amplifikasi

Langkah pertama, disiapkan *microtube* 0,2 ml sejumlah sampel, control positif(+) dan control negatif(-) serta diberi kode sesuai kode sampel. Tambahkan satu *mikrotube* untuk wadah koktail yang akan digunakan untuk *mixing*. Proses *mixing* pada *One Step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan komposisi bahan koktail untuk amplifikasi virus TiLV (RNA) yang disajikan dalam Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Komposisi bahan koktail *One Step* RT-PCR untuk mendeteksi TiLV

Reagent RT-PCR	Volume(µl)
<i>2x Mastermix</i>	12.5
<i>Primer forward</i> (20µmol)	0.5
<i>Primer reverse</i> (20µmol)	0.5
<i>RT Enzim</i>	0.5
<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	7
<i>Template</i>	4
Jumlah	25

Sekuens *primer forward* dan *primer reverse* yang digunakan untuk uji TiLV disajikan pada Tabel 2 dibawah ini:

Tabel 2. Sekuens primer untuk mendeteksi TiLV

Primer	Sequens (5'to3')	Amplicon Length
First RT-PCR	TATGCAGTACTTCCCTGCCGTTG	415 bp
Nested ext-1ME1	GGCACAAGGCATCCTA	

Semi-nested PCR 7450/150R/ME2 ME1	TATCACGTGCGTACTCGTTCGTTG GGCACAAGGCATCCTA	250 bp
---	--	--------

Sumber: Dong HT *et al.*, 2017.

Tabel 3. Profil suhu amplifikasi *One Step* RT-PCR untuk mendeteksi TiLV

Kondisi <i>Condition</i>	Suhu <i>Temperature (°C)</i>	Waktu <i>Time</i>	Siklus <i>Cycle</i>
Transkripsi balik <i>Reverse transcriptatoin</i>	50	30 menit	1
Denaturasi awal <i>Pre-denaturation</i>	94	2 menit	1
Denaturasi <i>Denaturation</i>	94	30 detik	
Penempelan <i>Annealing</i>	60	30 detik	30
Pemanjangan <i>Extension</i>	72	30 detik	
<i>Final Extension</i>	72	5 menit	1
<i>Hold End</i>	4	2 menit	1

Sumber: Dong HT *et al.*, 2017.

Hasil dari proses *One step* RT-PCR adalah produk cDNA yang akan digunakan pada reaksi *Semi Nested* PCR. Komposisi untuk amplifikasi

virus TiLV pada *Semi Nested* PCR untuk setiap amplicon disajikan dalam Tabel 4 dibawah ini:

Tabel 4. Komposisi koktail *Semi Nested* PCR untuk mendeteksi TiLV

Reagent-Nested PCR	Volume(µl)
<i>2xMaster Mix</i>	12.5
<i>Primer Nested Forward (20 µmol)</i>	0.5
<i>Primer Nested Reverse (20µmol)</i>	0.5
<i>Nuclease freewater (NFW)</i>	7.5
<i>Template</i>	4
Jumlah	25

Jumlah komposisi koktail disesuaikan dengan jumlah amplicon. Semua *reagent* dicampurkan dalam *microtube* kecuali *template*. *Template* yang digunakan pada *Semi Nested PCR* ini adalah hasil dari *One step RT-PCR*. *Semi Nested PCR* ini menggunakan *primer nested forward* dan *nested reverse*. Kedua primer tersebut digunakan untuk tahap kedua amplifikasi untuk memotong DNA target menjadi lebih spesifik. Menurut Dong (2017), pada tahap *nested PCR* ini akan menghasilkan panjang amplicon 250 bp.

Koktail dibagikan pada *microtube* 0,2 ml masing-masing sebanyak 21 μ l.

Template (hasil amplifikasi *Onestep RT-PCR*) ditambahkan sebanyak 4 μ l kedalam *microtube* sesuai dengan kode sampel. Kontrol positif TiLV ditambahkan sebanyak 4 μ l pada *microtube* yang telah diberi kode (+). Pada *microtube* (-) ditambahkan larutan NFW sebanyak 4 μ l. Semua sampel tersebut divortex dan *spindown* untuk menghomogenkan dan meluruhkan larutan yang ada pada dinding *microtube*. *Microtube* dimasukkan ke mesin *Thermalcycler* (PCR).

Profil suhu amplifikasi yang terjadi didalam *Thermalcycler* (PCR) disajikan pada Tabel 5 dibawah ini:

Tabel 5. Profil suhu amplifikasi *Semi Nested PCR* untuk mendeteksi TiLV

Kondisi <i>Condition</i>	Suhu <i>Temperature(°C)</i>	Waktu <i>Time</i>	Siklus <i>Cycle</i>
Denaturasi awal <i>Pre-denaturation</i>	94	2 menit	1
Denaturasi <i>Denaturation</i>	94	30 detik	
Penempelan <i>Annealing</i>	60	30 detik	25
Pemanjangan <i>Extension</i>	72	30 detik	
<i>Final Extension</i>	72	5 menit	1
<i>Hold End</i>	12	2 menit	1

Sumber: Dong HT *et al.*, 2017

Semi nested PCR ini menghasilkan amplicon dengan panjang 250 bp. Sampel hasil amplifikasi *Seminested*

PCR bisa digunakan untuk tahap selanjutnya.

Elektroforesis

Pembuatan agarose ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 2 g yaitu dengan konsentrasi 1,5%. Serbuk agarose tersebut dimasukkan kedalam *beaker glass* dan ditambahkan 120 ml 1X TAE *Buffer* dan dihomogenkan. Larutan *agarose* dipanaskan menggunakan *microwave* selama 4 menit dengan suhu *high temperature* dan diaduk sampai larutan berwarna bening. *Beaker glass* diambil dari dalam *microwave* dan didiamkan beberapa menit sampai tidak ada gelembung dan tidak terlalu panas. SYBR® *safe* sebanyak 5 µl ditambahkan kedalam *beaker glass* dan dihomogenkan. Pewarna SYBR® *safe* dapat berinteraksi diantara pasangan basa pada DNA dan menangkap sinar *ultraviolet* sehingga pendaran dari *ultraviolet* dapat terlihat. Pemakaian SYBR® *safe* lebih aman jika dibandingkan dengan Etidium Bromida (EtBr) yang bersifat karsinogenik (Amalia, 2013). Larutan agarose dituangkan ke cetakan agar yang sudah dipasangkan *combs* dengan posisi berhadapan dan ditunggu *gel agarose* memadat. Cetakan dan sisir dibuka lalu di pasang pada alat elektroforesis dan siap digunakan untuk elektroforesis. Menurut Pakpahan (2015) Elektroforesis gel agarose merupakan metode *standart* yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi

fragmen DNA. Konsentrasi gel agarose yang digunakan dalam proses elektroforesis merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi laju migrasi DNA untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan berat molekul. Konsentrasi gel agarosa yang rendah memberikan resolusi yang baik untuk fragmen yang besar antara band yang dekat ukurannya.

Prosedur running elektroforesis yang dilakukan di Balai KIPM Surabaya I yaitu gel agarose yang sudah memadat diletakkan pada elektroforesis set dengan posisi *well* berada pada kutub anoda. TAE *buffer* 1X ditambahkan sampai menutupi *gel agarose*. Amplikon dan *marker* disiapkan. *Well* pertama dimasukkan 5 µl *marker*, *well* kedua diisi dengan 8 µl kontrol positif dan *well* ketiga diisi dengan 8 µl kontrol negatif. *Well* selanjutnya diberi 8 µl DNA sampel secara berurutan. Elektroforesis set ditutup dan dihubungkan pada *power supply*. Diatur *voltase* sebesar 120 volt dengan waktu 40 menit.

Setelah proses running elektroforesis, dilakukan interpretasi hasil dengan menggunakan *UV Transiluminator* untuk interpretasi hasil pita band DNA sampel dengan sinar UV.

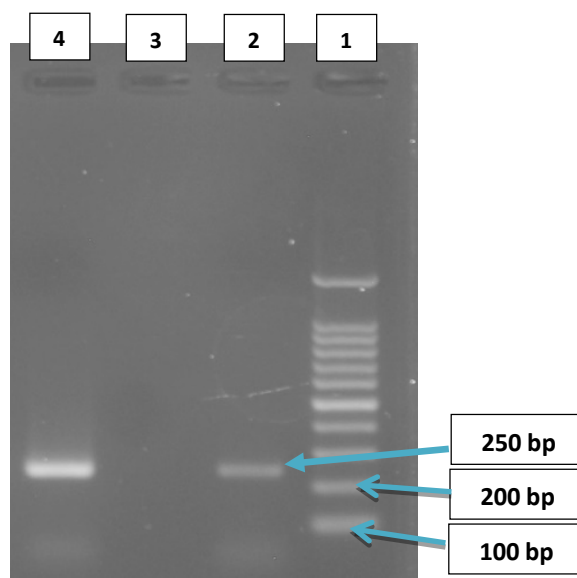
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisa Hasil

Hasil deteksi virus TiLV pada ikan nila di Balai KIPM Surabaya I pada

tanggal 1 Januari sampai dengan 30 Juni 2021, diperoleh sebanyak 35 sampel ikan Nila. Dari seluruh sampel diperoleh hasil bahwa 35 sampel yang diperiksa ada 1 sampel yang positif TiLV. Berikut contoh hasil sampel

positif TiLV dan berdasarkan hasil elektroforesis. Contoh hasil sampel ikan nila positif TiLV yaitu pada bulan Juni dengan kode sampel 3004 yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis positif TiLV : 1. DNA ladder (marker); 2. Kontrol Positif; 3. Kontrol Negatif; 4. Kode Sampel 3004 (BKIPM Surabaya I)

Gambar 1 merupakan salah satu contoh sampel uji dengan kode 3004 dinyatakan positif TiLV. Terdeteksinya TiLV apabila muncul pita band pada 250 bp. Selain itu, Pranawaty *et al.* (2012), menambahkan bahwa ketebalan pita DNA yang beragam dapat terjadi karena nilai kemurnian dan nilai konsentrasi masing-masing sampel yang berbeda. Nilai konsentrasi dari DNA yang lebih kecil akan menghasilkan DNA band yang lebih tipis bahkan tidak nampak, sedangkan

konsentrasi dari DNA yang lebih besar akan menghasilkan DNA band yang lebih jelas.

KESIMPULAN

Dari kegiatan Penelitian tentang Deteksi TiLV (*Tilapia Lake Virus*) pada ikan Nila didapatkan hasil uji pada tanggal 1 Januari sampai dengan 30 Juni 2021 adalah sebanyak 35 sampel ikan nila yang masuk di BKIPM Surabaya I. Dari seluruh sampel

diperoleh hasil bahwa 35 sampel yang diperiksa ada 1 sampel yang positif TiLV yaitu pada bulan Juni dengan kode sampel 3004.

Apabila sampel ikan nila negatif TiLV maka sertifikat kesehatan ikan dapat diterbitkan dan dapat dilalulintaskan baik domestik maupun ekspor, namun apabila sampel ikan nila positif TiLV maka sertifikat kesehatan ikan tidak dapat diterbitkan dan tidak dapat dilalulintaskan baik domestik maupun ekspor.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia,U. 2013. Optimasi Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk Deteksi *Salmonella spp.* Pada Udang Segar. Institut Pertanian Bogor. Skripsi. 51hlm.
- Auerkari, E.I., H. Sunarto dan A. Djaiz. 1998. RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*): suatu cara pendeteksi perubahan-perubahan ekspresi gen pada penyakit. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 5(3):162-165.
- 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.
- Basyah,B.L.,M.Jannah, dan Q.C.Puspita. 2015. Perancangan aplikasi pembudidayaan ikan lele berbasis web. *Jurnal Ilmiah Fifo*7(1):75 – 90.
- Daris. 2017. Motivasi belajar pada anak jalanan yang memutuskan untuk tetap bersekolah studi kasus pada anak jalanan diKota Samarinda. *Psikoborneo*.5(1):68-82.
- Djaelani, A.R. 2013. Teknik Pengumpulan Data dalam Penelitian Kualitatif. *Majalah Ilmiah Pawiyatan*. 20(1):82-92.
- Dong, HT., S. Siriroob., W. Meemetta., W. Santimanawong., W. Gangnonngiw., N. Pirarat., P. Khunrae., T. Rattanarojpong., R. Vanichviriyakit dan S. Senapin. 2017. A warning and improved PCR detection method for tilapia lake virus (TiLV) disease in Thai tilapia farms. *NACA*.1-3.
- Dwinanti. S. H. 2006. Keberadaan *White Spot Syndrome Virus (WSSV)*, *Taura Syndrome Virus (TSV)* dan *Infectious Hypodermal Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)* Di Tambak Intensif Udang *Vannamei Litopenaeus vannamei* Di Bakauheni, Lampung Selatan. Skripsi. Bogor : Program Studi Teknologi dan Manajemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Eriawati. N. N. 2019. NILA BALI Bebas Tilapia Lake Virus (TiLV). Kementerian Kelautandan Perikanan.23 Januari 2019. Hlm 4.
- 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.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*.10(1):61- 67.
- Giacomazzi, S., F. Leroi and J.J. Joffraud. 2005. Comparison of three methods of DNA extraction from cold- smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology*.98(5):1230-1238.
- Hamdi, A.S. dan E. Bahrudin. 2015. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi dalam Pendidikan. Dee publish. Yogyakarta. 179 hlm.
- Koesharyani, Isti., 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.
- Mariya, S. S. 2010. Isolasi konstruksi dan rekombinasi gen pengkode *reverse transcriptase* asal *Siva Retrovirus-2*(SRV-2). *Skripsi*. 30hlm.
- Muljono,P. dan Djaali. 2007. Pengukuran Dalam Bidang Perikanan. Grasindo. Jakarta. 143 hlm.
- Novriadi, Romi., S. Agustatik dan D. O. N. Tanjung. 2015. Identifikasi keberadaan *nervous necrosis virus* dan *iridovirus* pada budidaya ikan laut di wilayahkerja balai perikanan budidaya laut batam. *Omni - Akuatika*. 14 (20): 54 -62.
- Pakpahan, S. E. 2015. Pengujian konsentrasi gel agarosa 1% dan 1,2% pada elektroforesis DNA *Mycobacterium Tuberculosis*. *Jurnal Kesehatan Rajawali*.5(9):19- 23.
- Pranawaty,R.N.,I.D.Buwonodan E.Liviawaty. 2012. Application of conventional polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR for detection of white spot syndrome virus in crab. *J.Fisheries and Marine*.3(4):61-74.
- Saleh,Nasil. 2007. Sistem produksi kacang-kacangan untuk menghasilkan benih bebas virus. *Iptek Tanaman Pangan*.2(1):66 -78.
- Sugiyono. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R.D.Alfabeta. Bandung. 334hlm.
- Tsofack. J. E. K., R. Zamostiano., S. Watted., A. Berkowitz., E. Rosenbluth., N.Mishra.,T.Briese.,W.I.Lipkin., R. M.Kabuusu.,H.Ferguson., J. D. Pozo., A. Eldar and E. Bachrach. 2016. Detection of *Tilapia Lake Virus* in Clinical Samples by Culturing and Nested Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.55(3): 759- 767.
- Utami.D.T.,S.B.Prayitno,S.HastutidanA. Santika. 2013. Gambaran parameterhermatologis pada ikan nila(*Oreochromis niloticus*) yang diberi vaksin DNA *Streptococcus iniae* dengan dosis yang berbeda. *Journal of Aquaculture Management andTechnology*.2(4):7-20.
- Yanti, M.E.G., N.E. Herliany, B.F.S.P Negara and M.A.F. Utami. 2017. Deteksi molekuler *white spot*

syndrome virus (WSSV) pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) di PT. Hasfam Inti Sentosa. *Jurnal Enggano*. **2** (2):156-169.

Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta. 275 hlm.