

SEMI-NESTED RT-PCR SEBAGAI METODE DETEKSI *Tilapia Lake Virus* (TiLV) PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Taofani Rizal Al Amin^{1*}, Arif Bimantara^{2*}, Annisa Khumaira

^{1,2,3}Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta

Abstrak

Produksi ikan nila Dusun Bokesan merupakan produksi ikan nila tertinggi di Kecamatan Ngemplak, Sleman, Yogyakarta. Beberapa penyakit yang dapat menyebabkan terjadinya kegagalan dalam budidaya ikan nila diantaranya adalah adanya infeksi virus *Tilapia Lake Virus* (TiLV). Berdasarkan permasalahan tersebut akan dilakukan penelitian sebagai antisipasi terhadap serangan infeksi virus TiLV terhadap ikan nila di Dusun Bokesan. Pemeriksaan virus tersebut dilakukan dengan menggunakan metode Semi-Nested RT-PCR. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan deteksi virus TiLV pada ikan nila menggunakan metode Semi-Nested RT-PCR serta primer MFT dapat digunakan pada deteksi. Penelitian ini dimulai dengan ekstraksi RNA, sintesis cDNA, nested PCR, dan elektroforesis. Sampel ikan nila yang memiliki gejala klinis diambil sebanyak 6 ekor. Parameter yang diamati yaitu gejala yang ditimbulkan virus TiLV dan hasil visualisasi UV *Transilluminator*. Hasil dari deteksi virus TiLV terdapat 6 sampel yang positif TiLV. Semi-Nested RT-PCR dapat digunakan untuk deteksi TiLV pada ikan nila menggunakan primer MFT. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu terdapat sampel ikan nila positif TiLV di Dusun Bokesan.

Kata kunci: Ikan nila, virus TiLV, RT-PCR, Semi-Nested PCR

Abstract

Bokesan village has the highest tilapia production in Ngemplak District, Sleman, Yogyakarta. Tilapia Lake Virus infection is one of several diseases that can cause tilapia cultivation failure (TiLV). Based on these issues, research will be conducted in preparation for the TiLV virus infection of tilapia in Bokesan Hamlet. The Semi-Nested RT-PCR method was used to examine the virus. This study aims to detect

TiLV virus in tilapia using the Semi-Nested RT-PCR and MFT Method. This study began with RNA extraction, followed by cDNA synthesis, nested PCR, and electrophoresis. The samples are six Nile tilapias that have clinical symptoms. The parameters observed were the symptoms caused by the TiLV virus and the visualization results of the UV Transilluminator. The results of the detection of the TiLV virus contained 6 samples that were tested positive for TiLV. Semi-Nested RT-PCR can be used for TiLV detection in tilapia using MFT primers. The study concluded that there are TiLV positive tilapia samples in Bokesan Village.

Keywords: Nile Tilapia, TiLV Virus, RT-PCR, Semi-Nested PCR

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara maritim yang luas dan memiliki potensi perikanan yang baik di laut maupun tawar. Indonesia memiliki berbagai macam jenis ikan, salah satunya yaitu ikan nila yang merupakan jenis ikan yang banyak diminati sebagai konsumsi serta merupakan komoditas ikan yang layak untuk diusahakan. Ikan nila banyak dijumpai di pasaran dalam bentuk olahan maupun ikan segar (Salsabila & Suprpto, 2019).

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan ikan air tawar dari keluarga *Cichlidae*. Ikan nila berasal dari Negara Afrika yang sudah banyak dibudidayakan dan sudah banyak tersebar di daerah subtropis, tropis, dan diberbagai Negara. Ikan ini merupakan ikan yang cepat tumbuh serta menjadi ikan kedua yang banyak dibudidayakan di dunia setelah ikan mas. Ikan nila memiliki protein yang lengkap (Karim *et al.*, 2020).

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) masuk pertama kali ke Indonesia pada tahun 1969 dan penyebarannya di Danau Tempe, Sulawesi Selatan. Ikan nila adalah ikan unggulan untuk dibudidayakan di Indonesia dengan tingkat produksi yang sangat pesat. Produksi ikan nila pada tahun 2018 tercatat sebanyak 1,12 juta ton atau sekitar 31,94% dari total produksi perikanan budidaya ikan air tawar di Indonesia (Nugroho *et al.*, 2017). Produksi ikan nila di Kecamatan Ngemplak memiliki produksi ikan nila terbesar dengan jumlah sebesar 17,53% dari total produksi ikan nila di Kabupaten Sleman yang memiliki jumlah produksi sebesar 30.101,60 kuintal. Hal tersebut

didukung oleh adanya ketersediaan benih yang memadai di Kecamatan Ngemplak (Andhika *et al.*, 2019).

Produksi ikan nila di Kecamatan Ngemplak mengalami kendala dalam budidaya, hal tersebut dikarenakan ikan nila terserang penyakit. Menurut Lestari (2015), penyakit yang sering menginfeksi ikan seperti parasit, virus, dan bakteri. Pada ikan, infeksi penyakit disebabkan oleh tidak seimbangnya faktor inang, patogen, dan lingkungan. Beberapa penyakit yang dapat menyebabkan terjadinya kegagalan dalam budidaya ikan nila diantaranya adalah adanya infeksi *Tilapia Lake Virus* (TiLV).

TiLV pertama kali ditemukan di Negara Israel dan beberapa negara di Asia diantaranya Thailand, Indonesia, dan Malaysia. TiLV merupakan untai tunggal yang terbungkus oleh virus RNA, yang terdiri dari 10 segmen genom (Jamal *et al.*, 2019). Penularan virus TiLV dapat melalui ikan yang telah terinfeksi ke ikan yang sehat melalui media air dalam waktu 2-3 hari, serta dapat menyebabkan kematian hingga 50% (Husna *et al.*, 2020). Beberapa gejala yang ditimbulkan oleh TiLV pada ikan nila yaitu terjadinya perubahan warna tubuh dan kerusakan pada mata (Koesharyani *et al.*, 2018).

Berdasarkan permasalahan yang ada, dapat diketahui bahwa pembudidayaan ikan nila di Dusun Bokesan perlu dilakukan pengujian lapangan terhadap serangan infeksi TiLV. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan penyusunan primer untuk deteksi TiLV menggunakan *Semi-Nested Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan sedang dalam proses publikasi. Primer yang akan digunakan sudah dilakukan pengujian *in silico* dan optimasi primer. Pada penelitian ini, akan dilakukan pengujian primer dan deteksi adanya infeksi virus TiLV pada ikan nila yang memiliki gejala klinis virus TiLV menggunakan metode Semi-Nested RT-PCR pada pembudidaya di Dusun Bokesan Kecamatan Ngemplak Sleman Yogyakarta. Adapun Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan deteksi virus TiLV pada ikan nila menggunakan metode Semi-Nested RT-PCR serta primer MFT dapat digunakan pada deteksi.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Pengambilan Sampel

Sampel uji diambil dari Dusun Bokesan yang mempunyai gejala klinis virus TiLV seperti perubahan warna tubuh, kerusakan pada mata dan erosi pada kulit. Selanjutnya ikan nila di masukkan kedalam plastik PE yang telah diisi air serta dimasukkan oksigen ke dalam plastik PE. Kemudian, plastik PE diikat menggunakan karet, lalu dibawa ke laboratorium.

2.2. Preparasi Sampel

Sampel ikan nila dilakukan pembedahan untuk mendapatkan organ target ginjal dan limfa. Penggunaan organ target ginjal dan limfa, karena tempat bereplikasinya virus tersebut. Setelah mendapatkan organ target lalu ditimbang dengan berat 100 mg. Kemudian organ target yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam tube yang baru.

2.3. Ekstraksi RNA

Prosedur ekstraksi RNA mengikuti protokol kit Direct-zol RNA Purification Kits mengacu pada penelitian Hayati *et al.*, (2020). Proses ekstraksi RNA mengikuti protokol kit dimulai dengan menggunakan organ target sebanyak 100 mg dan penambahan larutan 800 μ l Tri reagent, lalu dihancurkan menggunakan pestel. Setelah itu disentrifugasi pada 16.000 rpm selama 1 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan pada *microtube* baru. Pemurnian RNA dilakukan pada suhu kamar dan disentrifugasi pada 16.000 rpm selama 30 detik. Ditambahkan larutan etanol 95% dengan perbandingan 1:1 pada sampel dalam *microtube* dan di homogenisasi. Campuran ethanol dipindahkan sebanyak 700 μ l ke dalam Zymo spin column dan disentrifugasi pada kecepatan 16.000 rpm selama 30 detik, lalu supernatan dibuang. 400 μ l RNA wash buffer ditambahkan dan sentrifugasi. DNase dimasukkan sebanyak 5 μ l ke dalam mikrotube baru kemudian di tambahkan 75 μ l DNA *Digestion buffer* dan homogenisasi. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam spin column yang berisi sampel RNA, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 15-30 menit. 400 μ l Direct zolTM RNA *freWash* dimasukkan pada spin column dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 30 detik dilakukan sebanyak dua

kali. Tambahkan 700 μl RNA wash buffer dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 1 menit, pindahkan kolom ke tube baru. Elusi RNA dilakukan dengan menambahkan 100 μl DNase Free Water dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 selama 30 detik. Hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C .

2.4. Sintesis cDNA

Hasil ekstraksi RNA, akan dilakukan perubahan molekul RNA menjadi cDNA dengan mengikuti protokol kit ReverseTra Ace $-\alpha$ -TM (TOYOBO) untuk perubahan RNA ke cDNA mengacu pada penelitian Sujono *et al.*, (2021). RNase free H₂O 10 μl , 5x RT buffer 4 μl , dNTP mixture 2 μl , RNase inhibitor 1 μl , Random primer 1 μl , RNA μl , dan ReverTra Ace 1 μl di homogenisasi. Selanjutnya dilakukan PCR dengan kondisi inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, inkubasi pada suhu 42°C selama 20 menit, dan pemanasan pada suhu 99°C selama 5 menit. Hasil cDNA tersebut disimpan pada suhu pada 4°C sampai dengan suhu -20°C .

2.5. Nested PCR

1. Amplifikasi pertama

cDNA dari *Reverse Transcriptase*, akan dilakukan pengujian TiLV menggunakan PCR. Tahap amplifikasi TiLV dilakukan secara *double step* dengan mengikuti protokol kit GoTaq® Green Master Mix (M712). Penelitian ini mengikuti metode Choiriyah *et al.*, (2021). Step pertama pada amplifikasi TiLV menggunakan primer *forward* (5'- TTG-GGC-ACA-AGG-CAT-CCT-AC-3') dan primer *reverse* R1 (5'-TTT-CCC-TGC-CTG-AGT-TGT-GC-3') dengan *amplicon* sepanjang 415 bp. Komposisi reaksi PCR menggunakan GoTaq Green PCR master Mix (Promega) 12,5 μl , *Nuclease Free Water* 9,5 μl , primer forward dan reverse masing-masing 1 μl , dan RNA template cDNA 1 μl . Master mix dan RNA template akan digabung dalam tube 0,2 ml. Selanjutnya, dilakukan uji PCR menggunakan *Thermal Cycler* sebanyak 30 siklus: Pre denaturasi 95°C selama 2 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 54°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 30 detik, final ekstensi 72°C selama 5 menit.

2. Amplifikasi pertama

Nested PCR dilakukan dengan mengikuti protokol kit GoTaq® Green Master Mix (M712) dengan mengikuti metode Choiriyah *et al.*, (2021). Komposisi reaksi: hasil amplifikasi PCR step-1 sebanyak 1 µl digunakan sebagai template untuk nested PCR dengan target band 250 bp. Primer yang digunakan pada step-2, yaitu primer Forward (5'- TTG-GGC-ACA-AGG-CAT-CCT-AC-3') dan primer Reverse R2 (5'- CGT-GCG-TAC-TCG-TTC-AGT- 3'), master mix 12,5 µl; *Nuclease Free Water* 9,5 µl; primer *forward* dan *reverse* R2 masing-masing 1 µl digabung dalam tube 0,2 ml. Selanjutnya, dilakukan uji PCR menggunakan *Thermal Cycler* sebanyak 30 siklus: Pre denaturasi 95 °C selama 2 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, annealing 54 °C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 30 detik, final ekstensi 72 °C selama 5 menit.

2.5. Elektroforesis

Proses elektroforesis mengikuti metode Koesharyani *et al.*, (2018) dilakukan dengan meletakkan gel agarose 2 % ke dalam cetakan 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 µl dimasukkan ke dalam sumuran, kemudian di elektroforesis. Marker yang digunakan untuk proses elektroforesis, yaitu marker 100 bp dan arus 110 volt selama 40 menit. Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan dengan bantuan UV *Transilluminator* dengan target 250 bp.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Persiapan Sampel

Sampel ikan nila yang diambil dari Dusun Bokesan Kecamatan Ngemplak Sleman Yogyakarta berjumlah 6 ekor yang memiliki ciri ciri sakit atau memiliki gejala klinis dapat dilihat pada Gambar 9. Pemeriksaan gejala klinis selama penelitian dilakukan pada ikan yang diduga terinfeksi virus dengan mengamati kondisi fisik. Adapun ciri ciri kondisi fisik ikan yang diambil seperti kerusakan pada mata dan erosi pada kulit.

Pada deteksi TiLV langkah pertama yang dilakukan yaitu nekropsi untuk mengambil organ target. Organ yang menjadi organ target pemeriksaan TiLV yaitu organ ginjal dan limfa karena organ tersebut tempat terjadinya sirkulasi darah. Ginjal dan limfa merupakan transportasi tempat mengeluarkan atau mengangkut zat-zat yang berguna bagi tubuh ikan serta sumber penyakit, seperti bakteri, virus, dan parasit (Dan, 2016).

Setelah organ target didapatkan, kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan kit Zymo Research Kit. Proses ekstraksi RNA bertujuan untuk mendapatkan RNA yang murni. Ariyanti & Sianturi (2019) menyampaikan bahwa proses ekstraksi terdiri dari penghancuran membran sel, pemisahan RNA, dan presipitasi RNA.

Tahap pertama yang dilakukan pada proses ekstraksi RNA yaitu penghancuran membran sel dengan menambahkan Tri reagent dan dilakukan penggerusan. Proses perusakan sel menggunakan penggerus dapat mempermudah reagent pelisis dalam memecah sel. Berdasarkan penelitian Hutami *et al.*, (2018) pemecahan sel atau pelisis bertujuan untuk menghancurkan membran dan dinding sel agar pada bagian sel keluar.

Setelah itu, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan larutan berdasarkan berat molekulnya, sehingga didapatkan supernatan dan pelet. Penambahan etanol 96% bertujuan untuk menghilangkan senyawa kontaminan. Selanjutnya pindahkan reagent ke zymo spin kolom untuk menyaring pelet agar terpisah dari supernatan. Ditambahkan RNA wash buffer untuk pencucian RNA. Proses selanjutnya adalah penambahan DNase I dan DNA digestion buffer untuk mendegradasi DNA. Kemudian, dilakukan inkubasi suhu kamar selama 15 menit serta ditambahkan RNA prewash dan RNA wash buffer sebagai pengikat dan pencucian RNA dengan harapan RNA yang dihasilkan benar-benar murni dan tidak terdapat kontaminan. RNA murni yang didapatkan akan dijadikan sebagai template untuk proses sintesis cDNA. Hal ini sesuai dengan penelitian Sopandie & Suharsono, (2019) menggunakan RNA murni sebagai template sintesis cDNA.

3.2. Sintesis cDNA

Setelah proses ekstraksi RNA, kemudian dilakukan proses sintesis cDNA menggunakan metode *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR). Sintesis cDNA dilakukan karena materi genetik dari virus TiLV yaitu RNA, sehingga perlu dilakukan proses *Reverse Transcriptase* untuk merubah RNA menjadi cDNA. RT-PCR memerlukan enzim *reverse transcriptase*, dalam proses ini menggunakan enzim M-MLV (*Molony Murine Leukimia*) dari strain *E.coli*.

Menurut Prayitno *et al.* (2020) RT PCR menggunakan enzim *reverse transcriptase* untuk mengubah RNA menjadi cDNA. RT PCR membutuhkan primer yang berfungsi sebagai sintesis rantai DNA pada reaksi berantai *polymerase*. cDNA disintesis lewat transkripsi balik menggunakan cetakan (*template*) RNA total dan random primer (Sopandie & Suharsono, 2019). Keberhasilan sintesis cDNA dipengaruhi oleh kemurnian RNA bebas dari kontaminasi protein, polisakarida, DNA, dan integritas RNA (Okanti *et al.*, 2020).



Gambar 1. Hasil elektroforesis cDNA

Hasil elektroforesis cDNA menunjukkan adanya cDNA yang tipis atau sedikit. Hal ini dikarenakan pada proses sintesis cDNA tidak ada proses perbanyakan cDNA. Faktor yang mempengaruhi cDNA tipis dikarenakan RNA yang digunakan sebagai template memiliki pengotor. Hasil dari sintesis cDNA akan dijadikan sebagai template untuk proses PCR.

3.3. PCR

Setelah proses sintesis cDNA, selanjutnya dilakukan proses PCR. Sampel yang digunakan pada proses amplifikasi ini menggunakan cDNA. Proses amplifikasi

merupakan proses perbanyak DNA target menggunakan primer spesifik. Primer ini akan digunakan sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan di amplifikasi.



Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR sampel ikan nila, M (Marker), + (Kontrol positif), - (Kontrol Negatif), 1-6 (Sampel).

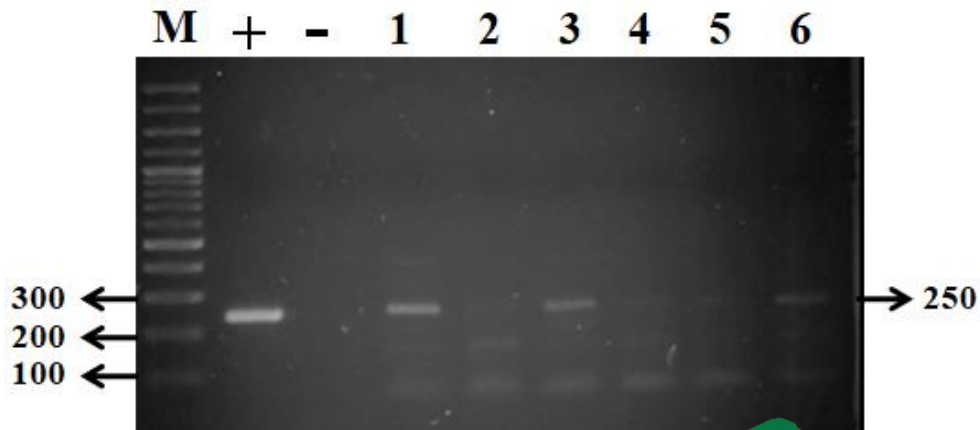
Hasil elektroforesis PCR menunjukkan tidak adanya band yang muncul pada target 415 bp. Hal ini disebabkan karena cDNA yang digunakan sebagai template memiliki sedikit virus, sehingga perlu dilakukan nested PCR untuk memperbanyak cDNA serta meningkatkan sensitivitas dan spesifitas. Hasil amplifikasi PCR selanjutnya digunakan sebagai templat untuk nested PCR.

3.4. Nested PCR

Proses nested PCR merupakan proses perbanyak fragmen DNA target menggunakan dua pasang primer spesifik. Deteksi TiLV pada penelitian ini menggunakan dua pasang primer, karena menggunakan metode *two-step* PCR. Hasil dari amplifikasi pertama akan dijadikan template untuk nested PCR. Menurut Ngaliyatun *et al.* (2013) Deteksi nested PCR dilakukan untuk meningkatkan keakuratan, sensitivitas, serta untuk mengurangi kontaminasi pada produk PCR. Nested PCR digunakan untuk memperkuat amplifikasi pada RT PCR.

Reagen yang digunakan pada nested PCR menggunakan GoTaq® Green Master Mix M712 (Promega). GoTaq® Green Master Mix berisi DNA polymerase untuk mensintesis dua untai DNA menjadi untai tunggal, MgCl₂ sebagai kofaktor untuk menstimulasi DNA polymerase, dNTPs sebagai sumber nukleotida pada proses PCR dan buffer PCR sebagai penyeimbang pH.

Tahap selanjutnya dilakukan elektroforesis. Elektroforesis bertujuan untuk mengamati hasil amplifikasi. Prinsip dari elektroforesis yaitu proses perpindahan molekul yang bermuatan negatif ke arah muatan positif.



Gambar 13. Hasil elektroforesis nested PCR sampel ikan nila M (Marker), + (Kontrol positif), - (Kontrol Negatif), 1-6 (Sampel).

Berdasarkan hasil deteksi menggunakan Semi-Nested RT-PCR, ditemukan bahwa terdapat 6 sampel yang teridentifikasi dan tergolong positif TiLV (1,2,3,4,5,6) pada gambar 13, karena hasil elektroforesis memperlihatkan *basepairs* yang sejajar dengan kontrol positif (+) dan Marker (M) dengan panjang 250 bp.

Penelitian terkait TiLV dilakukan oleh Jamal *et al.*, (2019) yaitu terkait deteksi TiLV pada ikan nila menggunakan metode Semi-Nested RT-PCR. Pada first step dengan panjang produk 415 bp dan pada semi nested dengan panjang produk 250. Menurut Koesharyani *et al.* (2018) sampel ikan nila dikatakan positif jika adanya band yang sejajar dengan marker dan kontrol positif pada panjang produk 250bp.

Pada penelitian ini menggunakan 1 primer forward dan 2 primer reverse, karena proses amplifikasi pada semi nested PCR dilakukan sebanyak dua kali. Penggunaan 1 primer forward dan 2 reverse bertujuan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas. Menurut Carr *et al.*, (2010) dan Wanger *et al.*, (2017) bahwa metode semi nested PCR dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas serta mengurangi jumlah dari pengikatan non spesifik, karena pada reaksi kedua

kebanyakan amplicon pada reaksi pertama dan hanya mengandung sekuens target dan sekuens di luar target.

Proses pemendekan produk PCR dari 415 bp-250 bp terjadi, karena proses semi nested PCR menggunakan dua pasang primer yang menghasilkan fragmen DNA yang lebih pendek dibandingkan pada PCR pertama. Pada primer *outer* akan mengamplifikasi fragmen DNA seperti PCR pada umumnya. Sedangkan pada primer *inner* akan mengamplifikasi hasil produk PCR dari primer *outer*, sehingga menghasilkan produk PCR yang lebih pendek dan spesifik. Menurut Detha, (2014) dalam penelitiannya menyatakan bahwa primer kedua akan mengikat produk PCR hasil amplifikasi pertama untuk melakukan amplifikasi primer kedua yang menghasilkan fragmen DNA yang lebih pendek.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Semi-Nested RT-PCR menggunakan primer MFT dapat digunakan untuk deteksi TiLV serta terdapat 6 sampel ikan nila positif TiLV.

4.2. Saran

Saran yang dapat peneliti rekomendasikan berdasarkan hasil penelitian tersebut yaitu diharapkan dapat dilakukan uji one tube Semi-Nested RT-PCR agar lebih efisien.

5. REFERENSI

- Andhika, R., Setyowati, N., & Qonita, R. A. (2019). Analisis Risiko Usaha Pembenuhan Ikan Nila Merah Di Kelompok Pembudidaya Ikan Mino Ngremboko Kecamatan Ngemplak Kabupaten Sleman. *Jurnal Agrisep: Kajian Masalah Sosial Ekonomi Pertanian Dan Agribisnis*, 18(2), 313–330.
- Ariyanti, Y., & Sianturi, S. (2019). Ekstraksi DNA Total Dari Sumber Jaringan Hewan (Ikan Kerapu) Menggunakan Metode Kit For Animal Tissue. 3(December 2018), 40–45.
- Carr, J., Williams, D. G., & Hayden, R. T. (2010). Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses. In *Molecular Diagnostics (First Edition)*. Elsevier Inc.

- Choiriyah, C., Firdhausi, N. F., Tyastirin, E., Rachmawati, Y., & Moch. Irfan Hadi. (2021). Optimization of Various Amplification Protocol of Yeast Isolated from Giant Honey Beehives (*Apis dorsata*). *Jurnal Riset Biologi Dan Aplikasinya*, 3(2), 81–87.
- Dan, I. (2016). Identifikasi KHV Dengan Uji Immunocytochemistry Berdasarkan Uji PCR Positif Pada Insang Ikan KOI (*Cyprinus*). 18(3).
- Detha, A. (2014). Identifikasi *Coxiella brunetii* Menggunakan Pengujian Polymerase Chain Reaction pada Kambing Di Kota Kupang. *Jurnal Kajian Veteriner*, 2(1), 103–110.
- Hayati, J. I., Gultom, J. L., Wurarah, M., & Rampengan, M. M. F. (2020). Analisis DNA Mitokondria Gen 16S rRNA Ikan Payangka Mitokondria DNA Analysis Gen 16S rRNA Payangka Fish (*Ophieleotris aporos*) that Lives in Tondano. 1(2), 70–78.
- Hutami, R., Bisyri, H., Sukarno, S., Nuraini, H., & Ranasasmita, R. (2018). Ekstraksi DNA dari Daging Segar untuk Analisis dengan Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Jurnal Agroindustri Halal*, 4(2), 209–216.
- Jamal, K., Rahmatia, F., & Dhewantara, Y. L. (2019). Deteksi Molekuler Tilapia Lake Virus (TiLV) Pada Ikan Nila (*oreochromis niloticus*) Yang Dilalulintaskan Di Balai Besar KIPM Jakarta I. *Jurnal Satya Minabahas*, 04(02), 115–121.
- Koesharyani, I., Gardenia, L., Widowati, Z., Khumaira, K., & Rustianti, D. (2018). Studi Kasus Infeksi Tilapia Lake Virus (TiLV) Pada Ikan Nila (*oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1), 85.
- Prayitno, P. A., Kusmintarsih, E. S., & Wahyono, D. J. (2020). Deteksi Molekuler Virus Dengue Serotipe 3 Pada Nyamuk *Aedes aegypti* Di Wilayah Purwokerto Timur. *BioEksakta : Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(2), 215.
- Sopandie, D., & Suharsono, U. W. (2019). Isolasi dan Pengklonan Fragmen cDNA Gen Penyandi H⁺ -ATPase Membran Plasma dari *Melastoma malabathricum* L . Isolation and Cloning of cDNA Fragment of the Gene Encoding for Plasma Membrane H⁺ -ATPase from *Melastoma malabathricum* L . 38(1), 67–74.
- Sujono, T. A., Trisharyanti, I., & Kusumowati, D. (2021). Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Metanolik dan Fraksi Buah Talok (*Muntingia calabura* L .) terhadap Sel RAW 264 . 7. 4(II), 82–95.

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Overview of Molecular Diagnostics Principles. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*, 233–257.

