

**PEMANTAUAN VIRUS DENGAN METODE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) DI
PANTAI UTARA JAWA TIMUR**

**MONITORING VIRUS BY PCR METHOD (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)
IN NORTH COAST, EAST JAVA**

Hari Suprpto dan Yulia Kartika

Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga
Kampus C Mulyorejo - Surabaya, 60115 Telp. 031-5911451

Abstract

The disease most dangerous for the cultivation activity is virus. Viruses are organisms subcellular that contain only nucleic acid (RNA or DNA) as genetic material. *Koi Herpes Virus* is one type of virus that causes mortality in cultured Cyprinids. KHV disease in Indonesia started in Blitar, East Java on March 2002 because the entry of imported koi fish that carry the virus KHV, while mortality percentage could reach 80% - 85%, which causes loss of about 5 billion rupiah. In addition of KHV, there are several types of viral diseases in shrimp is White Spot Syndrome Virus (WSSV), Taura Syndrome Virus (TSV), dan Yellow Head Virus (YHV). Disease can cause losses in farming activities, such as WSSV. WSSV is an endemic disease since 1995. Disease WSSV is exotic viral disease that attacks the shrimp monodon in 1998/1999 has resulted in decreased production of very large, so the Indonesian shrimp exports down 33,000 tons. Treatment of viral diseases is difficult because the virus resistant to certain antibiotics and chemical compounds. Therefore, prevention needs to be done, one through the monitoring activities conducted on the northern coast of East Java.

The method implemented is monitoring in location and identification of viruses by PCR (Polymerase Chain Reaction). Monitoring in location includes water quality measurements and sampling. Identification of virus carried by IQ 2000TM. The identification procedure includes extraction, amplification and electrophoresis.

Regional monitoring conducted on the northern coast of East Java includes Gresik, Lamongan, Tuban, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, and Sumenep. Water quality at locations quite well. Results activities of monitoring on the northern coast of East Java is disease *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) was found positive in several locations: Gresik, Lamongan and Tuban, while the virus *Taura Syndrome Virus* (TSV) and *Yellow Head Virus* (YHV) was not found at all locations. In tilapia, disease *Koi Herpes Virus* (KHV) was found positive in Tuban.

Keywords : Monitoring virus, East Java, PCR

Pendahuluan

Virus berbahaya karena penularan virus yang sangat cepat sehingga dapat mengakibatkan kematian massal bagi ikan dalam jumlah yang besar dengan waktu singkat. Salah satu contoh virus yang mewabah dan sulit untuk dikendalikan yaitu *Koi Herpes Virus* (KHV). KHV pertama kali dilaporkan pada tahun 1998 di Israel dan Amerika Serikat yang menyebabkan kematian masal ikan Mas dan Koi. Di Indonesia serangan KHV pertama kali dilaporkan pada awal tahun 2002 dan selama periode tersebut telah menyebar ke seluruh pulau Jawa dan Bali serta Sumatera bagian Selatan (Sugianti, 2005).

Penyakit KHV di Indonesia dimulai di Blitar Jawa Timur pada bulan Maret 2002 akibat masuknya ikan koi impor yang membawa virus KHV, adapun tingkat kematiannya bisa

mencapai 80% - 85% yang menyebabkan kerugian sekitar 5 milyar rupiah. Penyakit ini menyerang populasi ikan koi dan ikan mas dari berbagai umur dan ukuran baik yang dipelihara di kolam, danau maupun karamba jaring apung (Setyorini, 2008). Virus ini merupakan famili Herpesviridae yang mempunyai virion beramplop berdiameter sekitar 150 nm, dengan nukleokapsid ikosahedral dengan diameter 100 nm. Genomnya merupakan molekul dsDNA linier tunggal (Fenner, 1993).

KHV memiliki ukuran diameter 170-230 nm, sedangkan inti virus berukuran 100-110 nm dengan bentuk ikosahedral (Hutoran, et al., 2005). Hasil pematangan tipis pellet virus yang telah dimurnikan menunjukkan adanya partikel yang terbungkus dengan struktur seperti benang pada permukaan inti (Hutoran, et al., 2005). Antara pembungkus dengan

nucleocapsid dipisahkan oleh celah electron-lucen sekitar 10 nm (Handoyo, 2010). KHV juga berisi daerah padat-elektron asimetrik yang relatif kecil di dalam inti viral yang kemungkinan merupakan DNA genomik dan kompleks nucleoprotein (Hutoran, et al., 2005). Virus ini memiliki kepadatan bouyant sebesar 1.16 g/ml (Ilouze, et al., 2006).

White Spot Syndrome Virus (WSSV) merupakan salah satu jenis virus yang menyerang pada udang. Virus ini termasuk genus *Whispovirus* dari famili *Nimaviridae* dengan amplop trilaminar. WSSV merupakan virus jenis double-stranded DNA (dsDNA) yang memiliki virion yang besar (80-120 x 250-380 nm) dan berbentuk batang/elips (Lightner, 2004). Tahun 1993 merupakan tahun pertama kali *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) menyerang budidaya udang. Hal itu dikarenakan sanitasi yang tidak memadai sehingga dengan cepat virus dapat menyebar (Rosenberry, 2000). Vektor WSSV yaitu rotifer (Yan et al, 2004), moluska, cacing polychaete (Vijayan et al, 2005), crustacean termasuk *Artemia salina* (Chang et al, 2002), copepods, isopods, dan larva Euphydradae. Semua spesies tersebut dapat berakumulasi dengan konsentrasi tinggi WSSV, meskipun tidak terbukti terjadi replikasi virus (Lo et al, 1998).

Di Indonesia, penyakit *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) mewabah sejak tahun 1995. WSSV menyerang udang pada semua stadia baik benur maupun udang dewasa. WSSV dapat menyebabkan kematian pada udang hingga 100% selama 3- 10 hari sejak gejala klinis muncul (Aryani, 2008). Wabah penyakit udang yang disebabkan oleh WSSV, yang merupakan penyakit virus eksotik yang menyerang udang monodon pada tahun 1998/1999 telah mengakibatkan penurunan produksi yang sangat besar, sehingga ekspor udang Indonesia turun 33.000 ton (senilai US \$ 330 juta, saat itu Rp 10.000,- – 15.000,-/US \$), sebagai akibat penutupan 70 % usaha tambak di Jawa dan luar Jawa. Sejak saat itu selalu terjadi wabah, akibatnya usaha budidaya udang monodon di Indonesia kolap sampai sekarang belum dapat dipulihkan meskipun telah melakukan berbagai upaya.

Taura Syndrome Virus (TSV) merupakan spesies dari famili *Dicistroviridae* yang terdiri dari ssRNA. Umumnya virus ini menyerang udang terutama pada fase *Post Larva* (PL) dan mengakibatkan mortalitas yang tinggi karena memiliki tingkat mutasi spontan yang tinggi. Virus ini memiliki virion berdiameter 32 nm dan dapat bereplikasi di sitoplasma sel inang. Inang utama TSV yaitu

L.vannamei (Lightner et al, 1995). Penyakit pada udang lainnya yaitu *Yellow Head Virus* (YHV) yang menyerang pertama kali di Thailand pada tahun 1991 dan kemudian menyebar ke negara-negara Asia (Limuswan, 1991). Virus ini memiliki nukleokapsid sekitar 15 nm x 130-800 nm yang terakumulasi dalam sitoplasma. Virus ini termasuk ssRNA yang merupakan famili *Roniviridae* (Tang and Lightner, 1999).

Materi dan Metode

Pengukuran Kualitas Air

Pemantauan yang dilakukan langsung di lokasi salah satunya yaitu pengukuran kualitas air. Beberapa parameter yang diukur meliputi suhu, warna air, salinitas, pH, DO, ammonium, ammonia, nitrat dan nitrit.

Pengambilan Sampel

Ikan yang diambil meliputi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yaitu untuk identifikasi KHV. Organ yang diambil untuk dijadikan specimen identifikasi KHV yaitu insang. Sedangkan organ yang diambil pada udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) untuk identifikasi WSSV, TSV, dan YHV yaitu pleopoda (kaki renang), ekor, dan insang. Spesimen difiksasi dengan menggunakan alkohol 70%, disimpan dalam botol dan dimasukkan dalam cool box. Pergantian alkohol untuk pengawetan lebih lama dilakukan setiap 7 hari dengan alkohol 70% dengan suhu dibawah 4°C.

Identifikasi Virus dengan PCR IQ 2000™

Identifikasi virus dilaksanakan di laboratorium biologi molekuler dengan metode PCR dengan IQ 2000™. Prosedur identifikasi virus dengan PCR meliputi ekstraksi, amplifikasi, elektroforesis.

Ekstraksi Virus

Pada virus DNA, sampel sejumlah 20 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml dan ditambahkan 500 µl *Lysis buffer* kemudian sampel dihaluskan menggunakan pestle. Sampel diinkubasi pada suhu 95°C selama 10 menit kemudian disentrifuse pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 200 µl supernatan ditambahkan 400 µl etanol 95%, sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pellet dikeringkan dan dilarutkan dengan DEPC.ddH₂O atau *TE Buffer*.

Pada virus RNA, sampel 20-25 mg sampel ke dalam mikrotube 1,5 ml dan ditambahkan 100 µl CHCl₃, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit.

Supernatan sebanyak 200 µl ditambahkan 200 µl isopropanol, sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan buang isopropanol. Pellet ditambahkan alkohol 75%, sentrifuse dengan kecepatan 9000 rpm selama 5 menit dan larutkan pellet dengan DEPC.ddH₂O.

Amplifikasi PCR IQ 2000™

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *Thermal cycler*. *Reagen First PCR Kit IQ 2000* disiapkan dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 µl dengan komposisi yang berbeda. Pada KHV dan WSSV reagen yang ditambahkan yaitu 7,5 µl *First PCR Premix*, 0,5 µl *IQzyme*, 2 µl *DNA template* (sampel, kontrol +, kontrol -). Sedangkan untuk TSV dan YHV komposisi reagen yaitu 7 µl *First PCR Premix*, 0,5 µl *IQzyme*, *RT Enzyme Mix* 0,5 µl, dan 2 µl *RNA template* (sampel, kontrol +, kontrol -). Proses amplifikasi dimulai pada tahap 1 (*First PCR*) dengan suhu 94°C, 62°C, 72°C, dan 20°C. Setelah *First PCR*, ditambahkan *Nested PCR* yaitu sebanyak 14 µl *Nested PCR Premix* dan 1 µl *IQzyme*. Amplifikasi tahap 2 (*PCR Nested*) pada suhu : 94°C, 62°C, 72°C, dan 20°C.

Elektroforesis

Sampel/standart hasil amplifikasi sebanyak 8 µl ditambahkan dengan 2 µl 6x *Loading dye*, kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2% yang direndam dengan *TAE buffer* dengan kekuatan listrik 110-125 V selama 35-45 menit. Setelah elektroforesis, agarose direndam dalam larutan *Ethidium Bromide* (10 µl EtBr dilarutkan ke dalam 100 ml *aquadest*) selama 10 menit, kemudian agarose direndam dengan *aquadest* selama 10 menit (pencucian berulang). Agarose hasil pencucian diamati pada UV *tansilluminator* dan dilakukan analisis.

Hasil dan Pembahasan

Pemantauan virus dilaksanakan di pantai utara Jawa Timur meliputi : Gresik, Lamongan, Tuban, Bangkalan, Sampang, Pamekasan, dan Sumenep. Kualitas air pada umumnya relatif baik di seluruh daerah pemantauan. Namun, pada beberapa daerah kadar DO sangat rendah seperti di Bangkalan (2,36 mg/L) dan Sampang (1,06mg/L). Hal itu dikarenakan sistem sirkulasi air masih buruk dan pada beberapa kolam tidak dilakukan pergantian air, sehingga tidak terjadi difusi oksigen udara ke dalam air. Pada tambak udang, kualitas air relatif baik dan terkendali. Hal itu dapat dilihat dari suhu (25,55-34,72°C), DO (6,74-7,14 mg/L), salinitas (5-13 ppt), warna air (cokelat-kehijauan), pH (8,2-8,5), amoniak (0-

0,5 mg/L). Namun kandungan nitrat dan nitrit di atas batas wajar yaitu nitrat (10-50 mg/L), dan nitrit (0-1 mg/L). Hal itu dapat dikarenakan pada pembesaran udang diberikan pakan dalam jumlah besar sehingga kandungan nitrat dan nitrit tinggi.

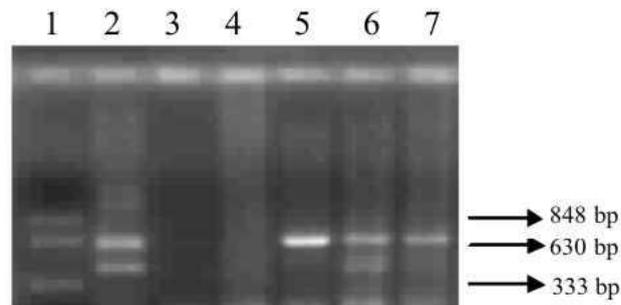
Koi Herpes Virus (KHV)

KHV merupakan penyakit yang diakibatkan oleh virus golongan DNA dari famili Herpesviridae. Virus ini merupakan virus yang mempunyai virion beramplop berdiameter sekitar 150 nm, dengan nukleokapsid ikosahedra dengan diameter 100 nm. Genomnya merupakan molekul dsDNA linier tunggal (Fenner, 1993). Ciri-ciri ikan yang tetrinfeksi KHV yaitu terdapat bintik putih pada insang, pendarahan pada insang, mata cekung, dan warna tubuh pucat. Kematian akan terjadi dalam waktu 24-48 jam setelah terdapat tanda-tanda klinis (Hartman, 2008). Menurut Sugianti (2005), kematian terjadi antara 1 – 5 hari setelah gejala awal. Kematian mencapai 100 % dalam waktu singkat.

Koi Herpesvirus (KHV) adalah penyakit yang disebabkan oleh virus yang menyerang ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*) dan ikan Mas (*Cyprinus carpio*). Saat ini KHV tidak hanya menyerang ikan Koi dan ikan Mas saja, tapi sudah mulai ditemukan pada ikan air tawar lainnya seperti ikan nila, ikan gurami dan ikan mujaer sehingga dalam kegiatan pemantauan dilakukan uji PCR KHV untuk komoditas ikan-ikan tersebut. Organ yang menjadi target infeksi KHV adalah organ insang, ginjal, otak dan hati karena organ tersebut diduga memiliki prevalensi (populasi virus) lebih tinggi dibandingkan dengan jenis organ lainnya (Tauhid *et. al.*, 2005 dalam Setyorini, 2008).

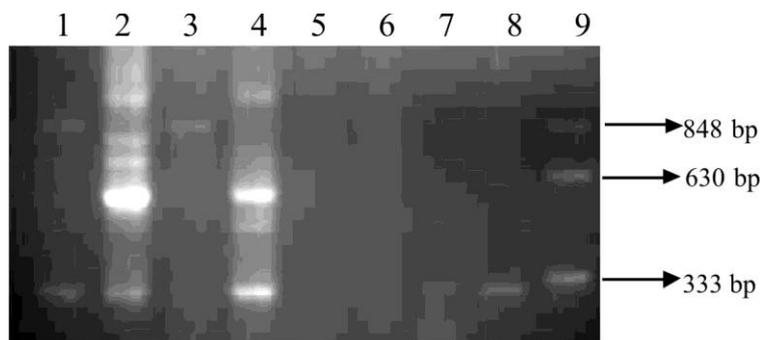
Pada pemantauan tahun 2010 ditemukan adanya penyakit *Koi Herpes Virus* (KHV) pada komoditas ikan nila hitam (*Oreochromis niloticus*) di Tuban, sedangkan untuk daerah lainnya tidak ditemukan KHV. Pada sampel ikan dari daerah Pamekasan, Lamongan dan Tuban menunjukkan sampel negatif KHV yaitu munculnya band pada 665 bp. Pada sampel ikan dari daerah Tuban menunjukkan sampel positif KHV yang diindikasikan dengan munculnya band pada 440 bp dan 665 bp.

Hasil pemantauan yang menunjukkan bahwa ikan nila di Tuban positif KHV. Secara eksternal, ikan nila positif KHV di Tuban tidak menunjukkan gejala klinis seperti ikan koi atau ikan mas yang terserang KHV, namun dalam pemeriksaan laboratorium ditemukan band pada 440 bp dan 665 bp yang menunjukkan bahwa



- Keterangan :
- Lane 1 : Marker 333 bp, 630 bp, 848 bp
 - Lane 2 : Kontrol Positif KHV 2000 reaksi
 - Lane 3 : Kontrol Negatif KHV
 - Lane 4 : Sampel Negatif KHV (Pamekasan)
 - Lane 5 : Sampel Negatif KHV (Lamongan)
 - Lane 6 : Sampel Positif KHV (Nila Hitam, Tuban)
 - Lane 7 : Sampel Negatif KHV (Nila Merah, Tuban)

Gambar 1. Hasil Elektroforesis KHV dengan metode IQ 2000



- Keterangan :
- Lane 1 : Sampel Positif WSSV sangat ringan (Tuban)
 - Lane 2 : Sampel Positif WSSV berat (Lamongan, Udang Mati)
 - Lane 3 : Sampel Positif WSSV sangat ringan (Lamongan)
 - Lane 4 : Sampel Positif WSSV berat (Gresik, Udang Mati)
 - Lane 5 : Sampel Negatif WSSV (Gresik)
 - Lane 6 : Sampel Negatif WSSV (Gresik)
 - Lane 7 : Kontrol Negatif WSSV
 - Lane 8 : Kontrol Positif WSSV
 - Lane 9 : Marker 333 bp, 630 bp, 848 bp

Gambar 2. Hasil Elektroforesis WSSV dengan metode IQ 2000

ikan tersebut positif KHV. Ikan nila positif KHV karena mudahnya virus untuk bermutasi. Mutasi adalah perubahan yang terjadi pada bahan genetik (DNA atau RNA), baik pada taraf urutan gen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom. Virus merupakan mikroorganisme yang mudah bermutasi karena virus memiliki struktur yang sangat sederhana dan hanya terdiri dari satu asam nukleat saja (Agustian, 2009).

White Spot Syndrome Virus (WSSV)

WSSV merupakan virus penyebab penyakit *White Spot Disease* (WSD) pada udang. Virus DNA dari famili *Nimaviridea* dan genus *Whispovirus* ini dapat hidup di kolam selama 3-4 hari. WSSV menyebabkan perubahan histopatologis, kerusakan hampir semua jaringan, hypertrophy, dan ditemukan badan inklusi berwarna esinofilik atau basofilik yang dikenal dengan *Cowdry Type-A inclusion body* (Lightner, 1996). Pemantauan ditemukan

adanya WSSV pada komoditas udang di beberapa lokasi. Berikut pembacaan hasil elektroforesis WSSV.

Sampel udang mati yang beraasal dari Gresik dan Lamongan positif terinfeksi WSSV stadium berat. Hal itu terlihat dari keluarnya band 296 bp, 550 bp dan diatas 848 bp pada lane 2 dan 4. Pada sampel udang hidup dari Lamongan dan Tuban juga terinfeksi WSSV stadium sangat ringan yaitu dengan adanya band 296 bp dan diatas 848 bp pada lane 1 dan 3. Sedangkan sampel udang hidup dari Gresik terdeteksi negatif terhadap WSSV (lane 5 dan 6 tidak ditemukan band).

Pada hasil pemantauan diketahui bahwa dua sampel udang mati (Gresik dan Lamongan) terinfeksi berat dengan kondisi fisik sampel insang geripis dan warna udang menjadi orange karena terkena panas matahari. Empat sampel udang hidup lainnya, dua diantaranya (Lamongan dan Tuban) terinfeksi sangat ringan. Perbedaan stadium infeksi dari virus menandakan tahapan replikasi virus di dalam tubuh ikan. Infeksi stadium berat berarti virus sedang/ telah melakukan replikasi di dalam sel, sedangkan untuk infeksi ringan berarti virus dalam kondisi masuk atau akan masuk ke dalam sel (penetrasi) dan infeksi ringan berarti virus berada di sekitar sel atau menempel di permukaan sel (adsorpsi). Kondisi sampel belum menunjukkan gejala klinis dan berarti udang tersebut bersifat *carrier*. Pada umumnya ikan muda yang sembuh dapat tahan terhadap penyakit tetapi dapat menjadi *carrier* seumur hidup, sehingga kemungkinan besar dapat menularkan WSSV ke udang lainnya baik

secara horizontal maupun vertikal (Sugianti, 2005).

Yellow Head Virus (YHV)

Yellow Head Disease (YHD) merupakan penyakit viral yang dapat menyebabkan kematian massal pada udang yang diakibatkan oleh YHV (*Yellow Head Virus*). Gejala klinis yang khas dari penyakit ini yaitu cephalothorax berwarna kekuning-kuningan. Pada pemantauan ini ini tidak ditemukan YHV. Positif YHV diindikasikan dengan keluarnya band 277 bp dan 777 bp dan negatif YHV bila tidak terdapat band atau band keluar pada 680 bp. Berikut merupakan hasil pembacaan elektroforesis untuk YHV.

Taura Syndrome Virus (TSV)

Taura Syndrome Virus adalah penyakit udang yang disebabkan virus RNA dari famili Dicistroviridae. TSV dapat menginfeksi udang *vannamei* dan *rostris (L. stylirostris)* yang keduanya telah diintroduksi di Indonesia. Serangan TSV pada umumnya terjadi pada umur 14-40 hari setelah penebaran di tambak, dengan tingkat kematian dapat mencapai 95%. Apabila penyakit terjadi pada umur 30 hari pertama, berarti infeksi berasal dari induk (vertikal), jika lebih dari 60 hari berarti infeksi berasal dari lingkungan (horizontal). Berikut merupakan hasil pembacaan elektroforesis untuk TSV.

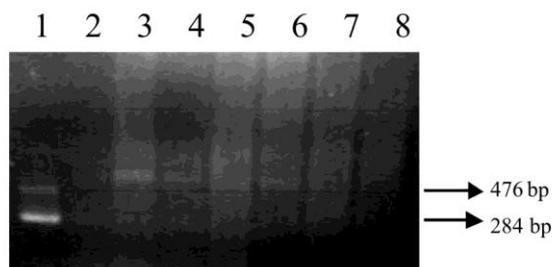
Taura Syndrome Virus (TSV) tidak ditemukan menginfeksi udang di semua lokasi pemantauan. Hal tersebut terlihat dari keluarnya band pada sekitar 680 bp yang terdapat diatas



Keterangan :

- Lane 1 : Kontrol Positive YHV
- Lane 2 : Kontrol Negative YHV
- Lane 3 : Sampel Negative YHV (Gresik)
- Lane 4 : Sampel Negative YHV (Gresik)
- Lane 5 : Sampel Negative YHV (Gresik, Udang Mati)
- Lane 6 : Sampel Negative YHV (Lamongan)
- Lane 7 : Sampel Negative YHV (Lamongan, Udang Mati)
- Lane 8 : Sampel Negative YHV (Tuban)

Gambar 3. Hasil Elektroforesis YHV dengan metode IQ 2000



Keterangan :

- Lane 1 : Kontrol Positif TSV
- Lane 2 : Kontrol Negatif TSV
- Lane 3 : Sampel Negatif TSV (Gresik)
- Lane 4 : Sampel Negatif TSV (Gresik)
- Lane 5 : Sampel Negatif TSV (Gresik, Udang Mati)
- Lane 6 : Sampel Negatif TSV (Lamongan)
- Lane 7 : Sampel Negatif TSV (Lamongan, Udang Mati)
- Lane 8 : Sampel Negatif TSV (Tuban)

Gambar 4. Hasil Elektroforesis TSV dengan metode IQ 2000

band positif (476 bp). Positif TSV terjadi apabila terdapat band 284 bp dan 476 bp, namun apabila tidak keluar band atau terdapat band sekitar 680 bp menunjukkan bahwa sampel negatif TSV.

Pemantauan virus di pantai utara Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK) golongan virus yang ditemukan yaitu *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada udang vannamei di beberapa lokasi yaitu Gresik, Lamongan dan Tuban. *Koi Herpes Virus* (KHV) pada ikan nila ditemukan positif di kabupaten Tuban. Sedangkan jenis virus *Taura Syndrome Virus* (TSV) dan *Yellow Head Virus* (YHV) tidak ditemukan di semua lokasi.

Daftar Pustaka

- Agustian, D. 2009. Materi Kelas X : Maret 2009. http://educorolla2.blogspot.com/2009_03_01_archive.html. 24/11/2010. 25 hal.
- Aryani, D., G. N. Susanto, Sumardi, Iswadi. 2008. Pengaruh Perubahan Salinitas Terhadap Virulensi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Putih. Universitas Lampung. Lampung. 9 hal.
- Chang Y.S., C.F. Lo, S.E. Peng, K.F. Liu, C.H. Wang, G.H. Kou (2002). White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV

when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, 49, 1–10.

- Fenner, F. J., E. P. J. Gibbs, F. A. Murphy, R. Rott, M. J. Studdert, D. O. White. 1993. *Veterinary Virology*. Terjemahan : Putra, H. IKIP Semarang Press. Semarang. 699 hal.
- Handoyo, B. 2010. Present Status KHV (*Koi Herpes Virus*) atau CNGV atau CyHV-3. <http://boyunaquaculturist.blogspot.com>. 27/11/2010.
- Hutoran, M., A. Ronen, A. Perelberg, M. Illouze, A. Dishon, I. Bejerano, N. Chen, M. Kotler. 2005. Description of an as Yet Unclassified DNA Virus from Diseased *Cyprinus carpio* Species. *Journal of Virology* Vol. 79, No. 4.
- Illouze, M., A. Dishon, M. Kotler. 2006. Characterization of a Novel Virus Causing a Lethal Disease in Carp and Koi. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. 147–156 p.
- Lightner, D.V., R. M. Redman, K. W. Hasson, and C. R. Pantoja. 1995. Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) : gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis Aquat Org* 21. 53-59 p.
- Lightner D.V. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid, Shrimp* World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 p.

- Lightner, D. V. 2004. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV, YHV : History in the Americas and Current Status. University of Arizona, Tuscon. USA. 20 p.
- Limuswan, C . 1991. Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns. Tansetakit, Bangkok, Thailand.
- Lo C.F., G.H. Kou. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, 33, 365–371.
- Mbwana J, *et al.* 2006. Molecular characterization of Haemophilus ducreyi isolates from different geographical locations. *J Clin Microbiol* 44(1):132-137
- Pharmawati, M. 2008. Optimalisasi Ekstraksi DNA dan PCR-RAPD Pada Grevillea spp. (Proteaceae). Universitas Udayana. 4 hal.
- Rosenberry, B. 2000. World Shrimp Farming 2000, Shrimp News International (2000). 324 p.
- Setyorini, N., A. Khusnah, L. Widajatiningrum. 2008. Kelangsungan Hidup Ikan Koi (*Cyprinus carpio koi*) Yang Terinfeksi KHV (*Koi Herpes Virus*). Balai Pengembangan Budidaya Air Payau Bangil. 9 hal.
- Sugianti, B. 2005. Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional Dalam Pengendalian Penyakit Ikan. Jurnal Makalah Falsafah Sains. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 hal.
- Tang, K. F. J., and D. V. Lightner. 1999. A Yellow-Head virus gene probe: application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. 173 p.
- Vijayan K.K., V. Stalin, C.P. Balasubramanian, S.V. Alavandi, V. Thillai, T.C. Santiago. 2005. Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, 63, 107–111.
- Westermeier. 2004. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons inc.
- Williams JG, *et al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-5.
- Yan D.C., S.L. Dong, J. Huang, X.M. Yu, M.Y. Feng, X.Y. Liu. 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, 59, 69–73.