



ANALISIS MOLEKULER *TILAPIA LAKE VIRUS* (TiLV) DI SENTRA BUDIDAYA BENIH IKAN GURAMI (*Osphronemus goramy*) JAWA TIMUR

Andi Jumria^{1*}, Muhamad Amin², & Mufasirin³

¹Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

²Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

³Departemen Parasitologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Jalan Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115, Indonesia

*Email: andijumria82@gmail.com

Submit: 01-11-2023; Revised: 05-11-2023; Accepted: 14-11-2023; Published: 30-12-2023

ABSTRAK: *Tilapia Lake Virus* (TiLV) merupakan *New Emerging Diseases* yang telah ditetapkan dan dimasukkan ke dalam *list* penyakit WOA. Virus ini dapat menginfeksi ikan air tawar maupun ikan air laut, menyebabkan kematian yang tinggi pada ikan nila hingga 90%. Metode *semi-nested Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-snPCR) untuk deteksi TiLV pada benih ikan gurami. Ditemukannya TiLV pertama kali di Thailand dan juga pernah ditemukan di Yogyakarta tahun 2021. Penelitian lebih lanjut telah dilakukan untuk melihat kerusakan dan variasi genetik disebabkan TiLV pada benih ikan gurami. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari variabilitas genetik dan kekerabatan isolat TiLV pada benih ikan gurami sebagai inang rentan yang ada di Jawa Timur. Hasil penelitian menunjukkan gejala klinis ikan, yaitu lesu, nafsu makan menurun, perilaku abnormal, refleks berkurang, pergerakan lamban, warna tubuh terlihat lebih gelap, kongesti, sirip gerispis, dan *exophthalmia*. Hasil RT-snPCR menunjukkan benih ikan gurami yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi TiLV semuanya positif. Hasil sekuensing diidentifikasi lebih lanjut menggunakan program BLAST, menunjukkan kesamaan identitas genetik sampel paling tinggi 96,8% dengan TiLV asal Israel (*Genebank Accession Number* NC 029927.1).

Kata Kunci: *Tilapia Lake Virus*, Benih Ikan Gurami, Molekuler.

ABSTRACT: *Tilapia Lake Virus* (TiLV) is a *New Emerging Disease* that has been defined and included in the WOA disease list (WOAH, 2022). This virus can infect both freshwater and marine fish, causing high mortality in *Tilapia* up to 90%. Reverse transcriptase method - Semi Nested Polymerase Chain Reaction (RT-snPCR) for detection of TiLV in *Osphronemus goramy*. TiLV was discovered for the first time in Thailand and was also found in Jogjakarta in 2021. Further research is needed to see the damage and genetic variation caused by TiLV in *Osphronemus goramy*. This study aims to study the genetic variability and homology of TiLV isolates in *Osphronemus goramy* as definitive hosts in East Java. The results showed clinical symptoms of lethargic fish, decreased appetite, abnormal behavior, reduced reflexes, sluggish movements, darker body color, congestion, thinning fins and *exophthalmia*. The PCR results showed that the *Osphronemus goramy* showing clinical symptoms of TiLV infection were all positive. The sequencing results were further identified using the BLAST program, showing the highest similarity of the genetic identity of the sample at 96.8% with TiLV from Israel (*Genebank Accession Number* NC 029927.1).

Keywords: *Tilapia Lake Virus*, *Osphronemus goramy* Fry Fish, Molecular.

How to Cite: Jumria, A., Amin, M., & Mufasirin. (2023). Analisis Molekuler *Tilapia Lake Virus* (TiLV) di Sentra Budidaya Benih Ikan Gurami (*Osphronemus goramy*) Jawa Timur. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), 1328-1341. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v11i2.9515>



PENDAHULUAN

Tilapia Lake Virus (TiLV) merupakan *New Emerging Diseases* yang telah ditetapkan dan dimasukkan ke dalam *list* penyakit WOA (WOAH, 2022). Merupakan virus RNA untai tunggal negatif (-ssRNA) dengan virion beramplop, berbentuk bulat dengan ukuran diameter 55-80 nm (Eyngor *et al.*, 2014; Tattiyapong *et al.*, 2018). Virus ini dapat menginfeksi ikan air tawar maupun ikan air laut, menyebabkan kematian yang tinggi pada ikan nila hingga 90% (Fathi *et al.*, 2017). Di Indonesia pada tahun 2016 terjadi kematian massal ikan nila di Lombok yang disebabkan infeksi TiLV (Koesharyani *et al.*, 2018). Sebanyak 16 negara telah melaporkan terdeteksinya TiLV dan mengakibatkan kematian massal pada ikan nila (Surachetpong *et al.*, 2020), dan memungkinkan menyebar ke beberapa belahan negara lainnya. Mobilitas perdagangan ataupun perpindahan ikan antar kolam menjadi penyebab penyebaran TiLV, sehingga memicu terjadinya tingkat stress yang tinggi pada ikan (Dong *et al.*, 2017; Ferguson *et al.*, 2014).

TiLV terdeteksi pada famili *Cichlidae* yang dilaporkan terjadi pada musim panas, dimana suhu air berkisar 22°C sampai 32°C di *Sarotherodon galilaeus* (St. Peter's fish) di Laut Galilea (Danau Kinneret) Israel (Eyngor *et al.*, 2014). Perkembangan penyakit TiLV menginfeksi ikan lain semakin banyak, tidak hanya pada famili *Cichlidae* saja. *Giant* gurami (*Osphronemus goramy*) salah satu komoditi perikanan yang terdeteksi dapat terinfeksi TiLV melalui studi *in vitro* laboratorium (Yamkasem *et al.*, 2019), dan pada tahun 2019 para peneliti menemukan *giant* gurami terinfeksi TiLV di Thailand pada area budidaya dan alam/liar (Chiamkunakorn *et al.*, 2019). Produksi ikan gurami Indonesia terbesar di dunia berdasarkan data *Food and Agriculture Organization* (FAO) mencapai lebih dari 98 persen dari total produksi dunia, diikuti negara lainnya seperti Thailand, Myanmar, Malaysia, Philippines, dan Singapore (Carus *et al.*, 2020). Ikan gurami (*Osphronemus goramy*) merupakan ikan asli Indonesia yang dilaporkan banyak dibudidayakan di daerah Sumatra, Kalimantan, dan Jawa (Nuryanto *et al.*, 2018). Berdasarkan data statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan, ikan gurami (*Osphronemus goramy*) termasuk ikan air tawar andalan, selain ikan nila (*Oreochromis niloticus*), ikan lele (*Clarias* spp), ikan mas (*Cyprinus carpio*), dan ikan patin (*Pangasius* spp) (Akbar *et al.*, 2023).

Koesharyani *et al.* (2018), melaporkan kematian massal ikan nila di daerah Lombok, Indonesia yang terinfeksi TiLV pada tahun 2016, dengan kondisi mata yang buram/katarak, serta cekung, abrasi kulit, serta perubahan warna tubuh menjadi lebih gelap. Pada tahun 2021 pertama kali ditemukannya ikan gurami terinfeksi TiLV di Yogyakarta, melalui Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor: Kep.17/MEN/2021 tentang penetapan jenis penyakit ikan karantina, organisme penyebab, golongan, media pembawa TiLV, termasuk PIK golongan I dengan inang rentan *Blue tilapia* (*Oreochromis aureus*), *Giant Gurami* (*Osphronemus goramy*), *Hybrid tilapia* (*Oreochromis niloticus* x



Oreochromis aureus), *Mango tilapia* (*Sarotherodon galilaeus*), *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*), *Red tilapia* (*Oreochromis* sp.), *Redbelly tilapia* (*Tilapia zillii*), *River barb* (*Barbonymus schwanenfeldii*), dan *Wild tilapia* (*Tristramellasis intermedia*). Kasus infeksi TiLV pada ikan gurami belum banyak ditemukan dan dilaporkan, dan juga belum ada data mengenai kerugian secara ekonomis yang disebabkan infeksi ini, sehingga informasi tentang variasi genetik TiLV dan sebarannya di Jawa Timur juga belum diketahui.

Berdasarkan permasalahan yang diuraikan di atas, perlunya penelitian untuk mempelajari homologi dan hubungan kekerabatan TiLV yang berasal dari Jawa Timur dengan TiLV yang berasal dari negara lain. Penelitian mengenai variasi genetik TiLV pada benih ikan gurami yang ada di Indonesia khususnya Jawa Timur dibandingkan dengan data yang ada pada *GenBank*, yang nantinya dapat mengetahui pola transmisi dan virus TiLV, serta dapat dijadikan salah satu data dalam tindakan pencegahan dan pengendalian penyakit TiLV.

METODE

Tempat dan Waktu

Sampel diambil pada bulan September sampai dengan November 2022, di sentra budidaya ikan gurami Kediri dan Tulungagung, Jawa Timur. Kemudian dilakukan pengujian analisa PCR di laboratorium Balai KIPM Surabaya I dan analisis sekuensing melalui 1st Base: PT. Genetika Science Indonesia.

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan peralatan seperti gunting, skalpel, pinset, gelas obyek, *cover slip*, nampan plastik, mikroskop (*Olympus CX-21*), timbangan analitik (*Mettler toledo*), *microtube*, *mikropipet eppendorf* (10 µl, 200 µl, 1000 µl), tip mikropipet, *vortex* (*IKA Vortex 3*), tabung *Eppendorf* (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml), *hot plate* (*Daihan scientific*), minispin (*Genereach*), *thermal cycler* (T100, Bio Rad, USA), *erlenmeyer*, *pellet pastle*, *microcentrifuge tube* (*Thermo*), *high UV transilluminator* (UVP), *elektoroforesis set* (*Cleaver scientific*), *freezer* lemari es (*Panasonic*).

Bahan yang digunakan PCR, antara lain *Silica Extraction Kit* (*GeneReach Biotechnology Corp*), *Master Mix* (*MyTaq HS Red Mix 2x* (*Bioline*), *ddH₂O/Nuclease Free water* (*PCR Grade Water*) (*Ambion AM993*), *Agarose gel* (1% *Gel O-Shooter*) (*LE Agarose*, R9012LE-500gr), *DEPC H₂O* (*GeneReach Biotechnology Corp*), *GT Buffer* (*GeneReach Biotechnology Corp*), *Ethanol 70%* (*Merck*), *TAE Buffer*, *SYBR Safe DNA gel stain* (*Invitrogen*), *Marker 100 bp DNA Ladder 100-3000 bp* (*GeneAld*), *Marker 100 bp DNA Ladder 100-1500 bp* (*Nexmark*), *template DNA*. Primer TiLV yang digunakan ME1(5'- GGT GGG CAC AAG GCA TCC TA-3) dan ME2 (5'-TAT CAC GTG CGT ACT CGT TCA GT-3').

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian survey eksploratif untuk mendeskripsikan suatu keadaan atau kondisi yang terjadi secara spontan atau alami tanpa adanya perlakuan apapun.

Prosedur Kerja

Sampling

Benih ikan gurami yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari 2 lokasi, yaitu Tulungagung dan Kediri. Sampel diambil dari benih ikan gurami yang dipelihara di petakan kolam yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi TiLV ataupun tidak menunjukkan gejala klinis. Jumlah sampel yang diambil, 18 ekor setiap lokasi sampling berdasarkan modifikasi Amoz (1985) dalam Akbar *et al.* (2021) berukuran 5-10 cm dan semua sampel diambil secara acak, untuk organ ikan yang *maribound*/mati disimpan dalam alkohol 90%. Benih yang menunjukkan gejala klinis di uji masing-masing, sedangkan yang tidak menunjukkan gejala klinis dijadikan satu dalam pengujiannya.

Deteksi TiLV

Metode yang digunakan untuk mendeteksi TiLV adalah semi *nested* RT PCR untuk semua sampel RNA yang diekstraksi menggunakan RNA silica kit. Desain primer yang digunakan pada Amplifikasi step 1 adalah primer *nested* ext-1 (5'-TAT GCA GTA CTT TCC CTG CC-3') dan primer ME1 (5'- GTT GGG CAC AAG GCA TCC TA -3') dengan hasil amplifikasi di 415 bp. Adapun desain primer yang digunakan pada Amplifikasi step 2 adalah primer 7450/150R/ME2 (5'- TAT CAC GTG CGT ACT CGT TCA GT -3') dan primer ME1 (5'- GTT GGG CAC AAG GCA TCC TA -3') dengan hasil amplifikasi di 250 bp (Dong *et al.*, 2017).

Komposisi reagen untuk amplifikasi step 1 menggunakan 12,5 ul *Gotaq Green Mastermix* (Promega), 1 ul Primer *Nested* ext-1 (10 µM), 1 ul Primer ME1 (10 µM), RT Enzym AMV 5 U (Promega) sebanyak 0,5 ul dan 8 ul *Nuclease Free Water*, kemudian ditambah 2 ul hasil ekstraksi RNA. Profil siklus amplifikasi pada alat PCR untuk amplifikasi step 1 adalah 50°C selama 30 menit untuk *Reverse Transcription* dan *pre heating* 94°C selama 2 menit masing-masing sebanyak 1 siklus. *Denaturation* 94°C selama 30 detik, *Annealing* 60°C selama 30 detik, *Extention* 72°C selama 30 detik masing-masing diulang sebanyak 30 siklus. *Final Extension* 72°C selama 5 menit dan *Hold End* 4°C selama 2 menit masing-masing sebanyak 1 siklus.

Komposisi reagen untuk amplifikasi step 2 menggunakan 12,5 ul *Gotaq Green Mastermix* (Promega), 1 ul Primer 7450/150R/ME2 (10 µM), 1 ul Primer ME1 (10 µM), dan 8,5 ul *Nuclease Free Water*, kemudian ditambah 2 ul hasil amplifikasi step 1. Profil siklus amplifikasi pada alat PCR untuk amplifikasi step 2 adalah *pre heating* 94°C selama 2 menit sebanyak 1 siklus. *Denaturation* 94°C selama 30 detik, *Annealing* 60°C selama 30 detik, *Extention* 72°C selama 30 detik masing-masing diulang sebanyak 25 siklus. *Final Extension* 72°C selama 5 menit, dan *Hold End* 4°C selama 2 menit masing-masing sebanyak 1 siklus. Elektroforesis dengan *gel agarose* 1,5% yang telah diberi *DNA Staining* digunakan untuk proses dokumentasi hasil dari produk PCR yang telah di amplifikasi.

Sekuensing DNA dan Analisis Filogenetik

Hasil produk PCR TiLV yang telah di amplifikasi menggunakan 2 pasang primer, amplifikasi step 1 adalah primer *nested* ext-1 dan ME1 di 415 bp, Amplifikasi step 2 adalah primer 7450/150R/ME2 -3'), dan primer dan ME1

dengan hasil amplifikasi di 250 bp, dijadikan *template* untuk analisis sekuensing melalui 1st Base: PT. Genetika Science Indonesia. Urutan nukleotida yang diperoleh di *alignment* menggunakan *software* MEGA XI (Tamura *et al.*, 2021), kemudian dibandingkan dengan data *GenBank* di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). *Software* Bioedit digunakan untuk membentuk pohon filogenetik dengan *neighbor joining method*, yang selanjutnya *software* Geneious prime digunakan untuk *identity* urutan nukleotida TiLV.

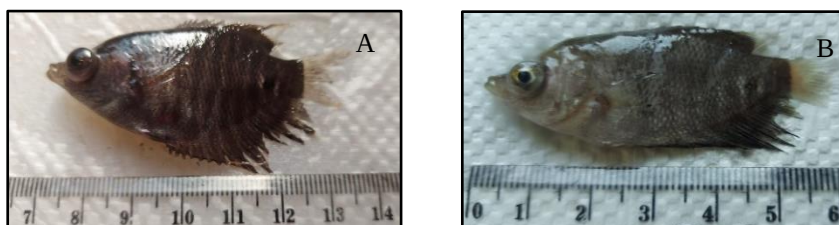
Analisis Data

Data yang diperoleh hasil PCR dari penelitian disajikan secara deskriptif dalam bentuk gambar, sedangkan data hasil sekuensing dilakukan analisis sekuensing menggunakan *software* komputer MEGA ver.11 dan dicocokkan dalam program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), kemudian dilakukan pensejajaran dengan data dari *GenBank* dibantu menggunakan *software* *Culstal W* dan ditampilkan dengan *TreeViewX*. Untuk konstruksi pohon filogenetik, ditentukan menggunakan metoda *Neighbour-Joining* (NJ tree) (Tamura *et al.*, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

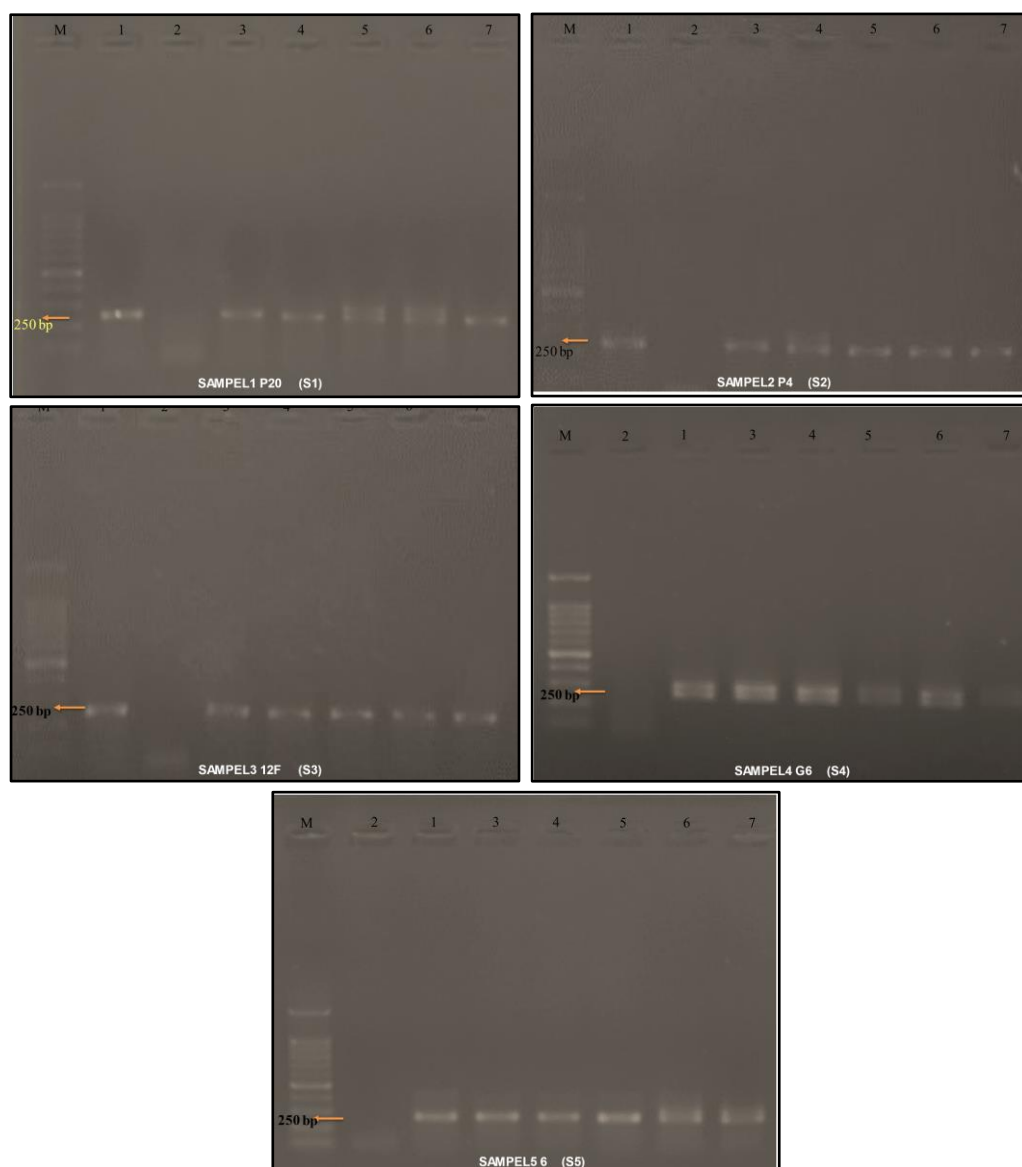
Sampel berasal dari Desa Sumbergempol, Kabupaten Tulungagung, dan Desa Badas Kabupaten Kediri, total 36 ekor sampel dari kedua daerah sampling, hanya 5 ekor ikan yang menunjukkan gejala klinis yang terlihat sangat mirip dengan ikan nila yang terinfeksi TiLV di beberapa negara, termasuk ikan nila yang terdeteksi TiLV di daerah Lombok, Nusa Tenggara Barat yang mengakibatkan kematian yang tinggi pada tahun 2016 (Koesaryani *et al.*, 2018). Secara fisik ikan terlihat lesu, nafsu makan menurun, perilaku abnormal, refleks berkurang, dan pergerakan lamban, gejala ini terlihat di kedua daerah sampling. Warna tubuh terlihat lebih gelap, *exophthalmia* dan sirip geripis yang terlihat pada ikan terinfeksi TiLV di Kediri, sedangkan ikan yang terinfeksi dari Tulungagung terlihat *exophthalmia*, sirip geripis, dan kongesti pada bagian ekor. Morfologi ikan yang terkena infeksi TiLV dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Perubahan Patologi Anatomi Benih Ikan Gurami Terinfeksi Virus TiLV: A) Benih Ikan Gurami dari Daerah Kediri, Warna Tubuh Lebih Gelap, *Exophthalmia*, dan Sirip Geripis; dan B) Benih Ikan Gurami dari Tulungagung *Exophthalmia*, Sirip Geripis, dan Kongesti pada Bagian Ekor.

Untuk memastikan sampel terinfeksi TiLV dari kedua daerah, dilanjutkan dengan analisis semi *nested* RT-PCR, semua sampel diuji per daerah dengan memisahkan per organ target (otak, mata, hati, limpa, dan ginjal), yang

selanjutnya dilakukan pengujian sesuai dengan prosedur (Dong *et al.*, 2017). Hasil elektroforesis dari 5 ekor benih ikan gurami menunjukkan patologi anatomi hasilnya terinfeksi TiLV, terlihat dengan adanya pita yang sejajar dengan kontrol positif di 250 bp, disemua organ benih ikan gurami yang diuji, dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan: M. Marker; 1) Kontrol Positif; 2) Kontrol Negatif; 3) Otak; 4) Mata; 5) Hati; 6) Ginjal; dan 7) Limpa.

Gambar 2. Hasil Elektroforesis pada Benih Ikan Gurami yang Terinfeksi TiLV, S1, S2, dan S3 Berasal dari Kediri, S4 dan S5 Berasal dari Tulungagung.

Produk hasil PCR positif TiLV dilanjutkan dengan pengujian sekuensing menggunakan primer yang sama, untuk mengetahui urutan nukleotida (adenin, sitosin, guanin, dan timin/urasil) dari gen TiLV. Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida isolat lokal TiLV dari Kediri dan Tulungagung sedangkan isolat

pembandingan dari gen bank isolat NC 029927.1 (Israel-Galilea 2011), MZ297925.1 (India 2017), dan OL539822.1 (Indonesia) yang dilanjutkan dengan analisa filogenetik.

Analisis filogenetik menggunakan *software* MEGA XI dan Bioedit untuk proses *alignent* terhadap urutan nukleotida TiLV yang akan dibandingkan dengan isolat yang ada di *GenBank*, perubahan susunan nukleotida akan sangat berpengaruh terjadinya mutasi. TiLV sudah dilaporkan tidak hanya spesifik menyerang ikan nila, tetapi sudah ditemukan dapat menginfeksi ikan lainnya, termasuk ikan gurami (Chiamkunakorn *et al.*, 2019; Yamkasem *et al.*, 2019) dan zebra fish (Rakus *et al.*, 2020; Widziolek *et al.*, 2021). Tipe perubahan susunan nukleotida akibat adanya mutasi yang terjadi dapat dilihat pada Tabel 1. dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea), Tabel 2 dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017), Tabel 3 dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia).

Tabel 1. Tipe Perubahan Nukleotida TiLV dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea 2011).

No.	Asal Daerah	Tipe Perubahan Nukleotida dari <i>GenBank</i> NC 029927.1								
		C	C	C	T	G	A	T	A	G
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		T	A	G	C	A	G	G	C	C
1	Sampel1 P20	3			3	2	1			
2	Sampel2 P4	5			4	2	4			
3	Sampel3 12F	3			3	2	1			
4	Sampel4 G6	4			4	1	4			
5	Sampel5 N6	2	2	1	6	4	5	1		

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan nukleotida.

Tabel 2. Tipe Perubahan Nukleotida TiLV dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017).

No.	Asal Daerah	Tipe Perubahan Nukleotida dari GenBank MZ297925.1								
		C	C	C	T	G	A	T	A	G
		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		T	A	G	C	A	G	G	C	C
1	Sampel1 P20	2			4	2	3		1	
2	Sampel2 P4	3			5	2	6		1	
3	Sampel3 12F	2			4	2	3		1	
4	Sampel4 G6	1			4	2	5		1	
5	Sampel5 N6	3	2	1	7	4	7	1	1	

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan nukleotida.

Tabel 3. Tipe Perubahan Nukleotida TiLV dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia).

No.	Asal Daerah	Tipe Perubahan Nukleotida dari <i>GenBank</i> OL539822.1								
		C	C	C	T	G	A	T	A	G
		↓ T	↓ A	↓ G	↓ C	↓ A	↓ G	↓ G	↓ C	↓ C
1	Sampel1 P20	2			6	3				1
2	Sampel2 P4	4			6	3	3			1
3	Sampel3 12F	2			6	3				1
4	Sampel4 G6	2			7	2	3			1
5	Sampel5 N6	4	2	1	9	5		1		1

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan nukleotida.

Perubahan susunan nukleotida TiLV pada benih ikan gurami yang terinfeksi, mempengaruhi profil urutan asam amino, dikarenakan adanya perubahan antara purin menjadi pirimidin ataupun sebaliknya antara pirimidin menjadi purin. Beberapa perubahan profil asam amino dapat dilihat pada Tabel 4. dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea), Tabel 5; dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017), Tabel 6; dan dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia) berikut ini.

Tabel 4. Tipe Perubahan Asam Amino dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea).

No.	Asal Daerah	Tipe Perubahan Asam Amino dari <i>GenBank</i> NC 029927.1												
		A	S	F	S	I	S	S	M	N	P	L	A	L
		↓ E	↓ P	↓ S	↓ N	↓ M	↓ G	↓ F	↓ I	↓ S	↓ Q	↓ A	↓ P	↓ S
1	Sampel1 P20				1			1	1					
2	Sampel2 P4							1	1	1				
3	Sampel3 12F				1			1	1					
4	Sampel4 G6					1			1	1				
5	Sampel5 N6	1	1	1	2		1	1	1	1	1			

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan asam amino.

Tabel 5. Tipe Perubahan Asam Amino dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017).

		Tipe Perubahan Asam Amino dari <i>GenBank</i> MZ297925.1												
No.	Asal Daerah	A	S	F	S	I	S	S	M	N	P	L	A	L
		↓ E	↓ P	↓ S	↓ N	↓ M	↓ G	↓ F	↓ I	↓ S	↓ Q	↓ A	↓ P	↓ S
1	Sampel1 P20				1			1	1					
2	Sampel2 P4							1	1	1				
3	Sampel3 12F				1			1	1					
4	Sampel4 G6					1			1	1				
5	Sampel5 N6	1	1	1	2		1	2	1	1	1			

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan asam amino.

Tabel 6. Tipe Perubahan Asam Amino dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia).

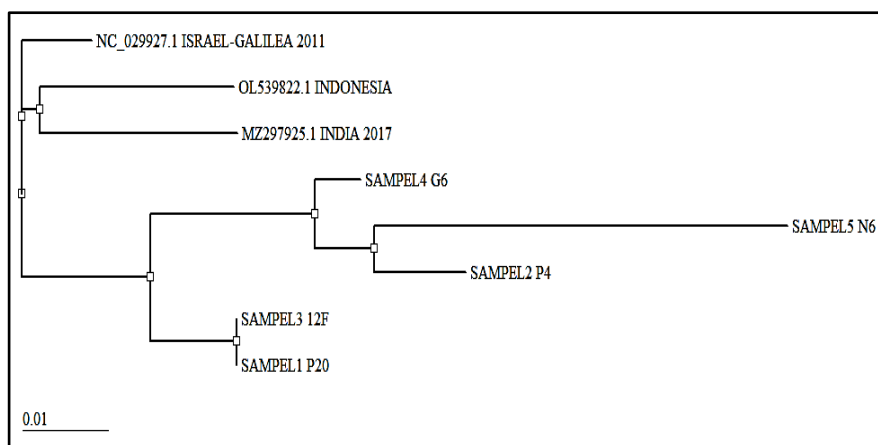
No.	Asal Daerah	Tipe Perubahan Asam Amino dari <i>GenBank</i> OL539822.1												
		A	S	F	S	I	S	S	M	N	P	L	A	L
		↓ E	↓ P	↓ S	↓ N	↓ M	↓ G	↓ F	↓ I	↓ S	↓ Q	↓ A	↓ P	↓ S
1	Sampel1 P20				1			1	1			1	1	1
2	Sampel2 P4							1	1	1		1	1	1
3	Sampel3 12F				1			1	1			1	1	1
4	Sampel4 G6					1			1	1		1	1	1
5	Sampel5 N6	1	1	1	2		1	2	1	1	1	1	1	1

Keterangan: Angka menunjukkan frekuensi perubahan asam amino.

Nilai *identity* pada Tabel 7 digunakan sebagai patokan untuk mengetahui persentase homolog isolat sampel yang dimiliki terhadap sekuens *reference* yang berasal dari *GenBank*. Rekonstruksi filogenetik berdasarkan metode *Neighbor Joining* menggunakan *software Bioedit version 3.6a2.1* yang membandingkan isolat lokal TiLV dengan data *GenBank* dari negara Israel, India, dan Indonesia (Gambar 3).

Tabel 7. Nilai Homolog Nukleotida Isolat Lokal terhadap Isolat TiLV Lain dari GenBank.

Sekuen Nukleotida	Nilai Homolog (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1. NC 029927.1 Israel-Galilea 2011		96.8	94	96.8	95.6	90.8	96.8	96.8
2. Sampel 1 P20	96.8		95.6	100	96.4	92.4	95.2	95.2
3. Sampel 2 P4	94	95.6		95.6	97.6	94.4	92.4	93.2
4. Sampel 3 12F	96.8	100	95.6		96.4	92.4	95.2	95.2
5. Sampel 4 G6	95.6	96.4	97.6	96.4		94.4	94	94
6. Sampel 5 N6	90.8	92.4	94.4	92.4	94.4		89.2	89.2
7. MZ297925.1 India 2017	96.8	95.2	92.4	95.2	94	89.2		95.6
8. OL 539822.1 Indonesia	96.8	95.2	93.2	95.2	94	89.2	95.6	



Gambar 3. Pohon Filogenetik Berdasarkan Susunan Nukleotida TiLV Isolat Kediri dan Tulungagung Dipadankan dengan Isolat Lain dari GenBank.

Pembahasan

Gejala Virus TiLV pada Ikan Gurami

Sampel yang diambil dari daerah Kediri dan Tulungagung merupakan sentra budidaya ikan gurami di Jawa Timur, gejala klinis yang terlihat pada sampel benih ikan gurami pada kedua daerah ini terlihat juga pada ikan nila yang terinfeksi TiLV secara alami dan eksperimental, secara garis besar ikan terlihat lesu (Eyngor *et al.*, 2014; Ferguson *et al.*, 2014), nafsu makan menurun, perilaku abnormal (berenang ke permukaan dan tidak berperilaku *schooling*), refleks berkurang, dan pergerakan lamban (Dong *et al.*, 2017; Tattiyapong *et al.*, 2018; Mugimba *et al.*, 2020; Surachetpong *et al.*, 2020). Secara umum ikan yang terinfeksi penyakit terlihat lesu, lemah/lesu, tidak mau/menolak makanan, berenang miring, mulut selalu terbuka, bernafas dengan cepat, dan menabrak dinding kolam atau menggosok-gosokkan tubuhnya pada dinding kolam (Sarjito *et al.*, 2013).

Hasil Elektroforesis Sampel Benih Ikan Gurami Terdeteksi Positif TiLV

Hasil elektroforesis sampel benih ikan gurami terdeteksi positif TiLV di 250 bp, dan terlihat sejajar dengan kontrol positif. Hasil amplifikasi positif TiLV di 250 bp pada penelitian ini sama dengan penelitian Eyngor *et al.* (2014) dan Fathi *et al.* (2017) pada organ otak, hati, ginjal, dan limpa ikan positif TiLV



dengan menunjukkan pita DNA di 250 bp. Di Thailand (Dong *et al.*, 2017) menginformasikan adanya infeksi TiLV pada ikan nila pada organ hati, ginjal, otak, limpa, insang, dan jaringan otot. Selain organ di atas, melakukan penelitian infeksi TiLV dimulai dari ukuran *Fertilized eggs*, larva *yolk-sac*, benih, dan *fingerlings* termasuk sampel yang berhasil diarsipkan pada tahun 2012 hampir semua sampel positif TiLV di 250 bp. Mugimba *et al.* (2020), juga mendeteksi infeksi TiLV pada ikan nila eksperimen di organ otak, hati, ginjal, dan limpa.

Hasil Molekuler

Produk hasil PCR positif TiLV dilanjutkan dengan pengujian sekuensing menggunakan primer yang sama, menunjukkan perubahan-perubahan yang terjadi pada urutan nukleotida di sepanjang 250 bp, menggunakan *software* MEGA ver. 11, yang sebelumnya telah dilakukan BLAST melalui *online* program dari NCBI. Program ini memberikan informasi mengenai persentase homolog dan mutasi yang terjadi berupa insersi, delesi, maupun substitusi (transisi atau transversasi). Penelitian ini menunjukkan terjadinya salah satu jenis mutasi gen, karena adanya perubahan kode genetik pada nukleotida, adanya perubahan purin menjadi purin dari guanin (G) menjadi adenin (A), perubahan dari adenin (A) menjadi guanin (G), ataupun sebaliknya adanya perubahan pirimidin menjadi pirimidin dari *cytosine* (C) menjadi timine (T), perubahan timine (T) dari *cytosine* (C), pada Tabel 4; dicocokkan dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea), Tabel 5; dicocokkan dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017), Tabel 6; dan dicocokkan dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia) menunjukkan jenis *silent mutation* yang terjadi pada semua sampel dari Kediri dan Tulungagung, kondisi ini tidak mempengaruhi fungsi protein, dikarenakan perubahannya akan mengkode asam amino yang sama pula. Perubahan kode genetik *missense mutation* juga terjadi pada virus TiLV yang menginfeksi benih ikan gurami, terlihat adanya pertukaran purin menjadi pirimidin ataupun sebaliknya, perubahan *cytosine* (C) menjadi adenin (A), timine (T) menjadi guanin (G), adenin (A) menjadi *cytosine* (C), guanin (G) menjadi *cytosine* (C), serta kodon nukleotida yang diubah menyebabkan penyisipan asam amino selama proses translasi, asam amino yang terkait pada rantai polipeptida berubah yang berpengaruh berubahnya atau hilangnya fungsi enzim (Warmadewi, 2017).

Hasil analisis urutan nukleotida sepanjang 250 pasangan basa dapat mengkode 83 asam amino, terjadinya perubahan urutan nukleotida juga mengalami perubahan profil asam amino pada masing-masing sampel yang dapat dilihat pada Tabel 4; dari *GenBank* NC 029927.1 (Israel-Galilea), Tabel 5; dari *GenBank* MZ297925.1 (India 2017), Tabel 6; dan dari *GenBank* OL539822.1 (Indonesia). Beberapa perubahan yang terjadi karena adanya perubahan basa purin menjadi basa pirimidin ataupun sebaliknya, yaitu perubahan alanine (A) menjadi asam glutamat (E), serine (S) menjadi proline (P), phenilalanin (F) menjadi serine (S), serine (S) menjadi asparagine (N), isoleusine (I) menjadi methionine (M), serine (S) menjadi glicine (G), serine (S) menjadi phenilalanin (F), methionine (M) menjadi isoleusine (I), asparagine (N) menjadi serine (S), proline (P) menjadi asam glutamat (Q), leusine (L) menjadi alanine (A), alanine (A) menjadi proline (P), dan leusine (L) menjadi serine (S). Substitusi asam amino yang dimediasi mutasi dapat mempengaruhi struktur dan stabilitas protein yang dapat



menyebabkan perubahan fungsi protein (Ke & Zhang, 2023). TiLV merupakan salah satu virus RNA, memiliki waktu generasi yang singkat dengan tingkat mutasi yang tinggi, setiap mutasi membantu virus menghindari sistem kekebalan tubuh inang (Shao *et al.*, 2017). Keragaman mutasi yang terjadi dimungkinkan karena virus melakukan penyesuaian agar dapat melekat pada reseptor inang (Saragih & Junaidi, 2021).

Jarak genetik pada hasil penelitian ini menunjukkan isolat lokal TiLV berdasarkan jarak percabangannya sesuai dengan awal mula ditemukannya TiLV yang berasal dari Israel, kemudian menyebar ke beberapa negara Asia termasuk India, hingga ditemukan pertama kalinya di Indonesia pada tahun 2018. Tersebarunya TiLV di belahan benua Asia karena adanya aktifitas lalu lintas impor produk perikanan, semakin banyaknya inang rentan TiLV dikarenakan adanya kegiatan importasi benih maupun induk ikan di beberapa negara dunia (Tang *et al.*, 2021), sehingga memungkinkan membentuk variasi genetik TiLV karena tekanan dan pengaruh lingkungan. Hal ini terlihat dari hasil analisa homologi pada penelitian ini, dimana nilai *identity* sampel dari Kediri S1 dan S3 dibandingkan dengan isolat dari Israel hanya 96,8%, sedangkan dibandingkan dengan isolat dari India dan Indonesia hanya 95,2%, sampel S2 dibandingkan isolat Israel hanya 94%, India dan Indonesia hanya 92,4% dan 93,2%. Sampel dari Tulungagung S4 dibandingkan isolat Israel hanya 95,6%, sedangkan dari India dan Indonesia hanya 94%, untuk sampel S5 dibandingkan isolat Israel hanya 90,8%, sedangkan Isolat India dan Indonesia hanya 89,2%, rendahnya persentase homolog perlu dikaji lebih lanjut untuk mengetahui tingkat virulensi TiLV pada ikan gurami.

Konstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini memperlihatkan bahwa TiLV yang ditemukan berasal dari negara awal ditemukannya, yaitu Israel. Pohon filogenetik yang terbentuk 4 klaster, yaitu klaster pertama terdiri dari isolat Israel, klaster kedua isolat dari India dan Indonesia, klaster ketiga terdiri dari isolat S2 dari isolat Kabupaten Kediri, S4 dan S5 dari Kabupaten Tulungagung, dan klaster keempat terdiri dari S1 dan S3 yang berasal dari daerah Kabupaten Kediri. Perlunya penelitian lanjutan terkait tingkat virulensi TiLV pada ikan gurami yang ada di Jawa Timur untuk mengetahui penyebab dari hasil nilai homolog yang rendah, Cann mengatakan, jika persentase homolog nukleotida yang rendah, maka tingkat virulensi virus tersebut akan semakin tinggi (Wahidi, 2014).

SIMPULAN

Benih ikan gurami yang terdeteksi positif TiLV dengan metode snRT-PCR pada fragmen pita DNA 250 bp menunjukkan gejala klinis *Exophthalmia*, warna tubuh lebih gelap, sirip geripis, dan kongesti. memiliki homolog dan kekerabatan yang dekat dengan isolat Israel, India, dan Indonesia, isolat Kediri memiliki homolog sebesar 94% - 96,8% dan Tulungagung 90,8% - 95,6% dibandingkan dengan isolat Israel, homologi isolat Kediri 92,4% - 95,2% dan Tulungagung 89,2%-94% dibandingkan dengan isolat India dan Indonesia.

SARAN

Perlunya penelitian lanjutan terkait studi epidemiologi genotip TiLV pada benih ikan gurami di beberapa daerah lainnya untuk melihat variasi genotip yang



ke depannya dapat dijadikan salah satu data dasar untuk penelitian terkait kandidat vaksin TiLV, selain peningkatan biosekuriti di sekitar area budidaya ikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Muhlin, S.Pi., M.Si., dan Tim Laboratorium Penguji Balai KIPM Surabaya I, yang telah mengizinkan penulis menggunakan fasilitas dalam proses penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- Akbar, M. A., Khairunnisa., Zahara, A. S., Mardiah., Sari, M. T., Adha, N., & Setyoko. (2023). Identification of Morphology and Morphometry of Fresh Water Fish Cultivated in Meurandeh Teungoh Village, Langsa City. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(2), 208-213. <http://dx.doi.org/10.29303/jbt.v23i2.4629>
- Carus, D., Arifin, Z. O., Subagja, J., Slembrouck, J., & New, M. (2020). *Osphronemus goramy: Cultured Aquatic Species Information Programme*. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Chiamkunakorn, C., Machimbirike, V. I., Senapin, S., Khunrae, P., Dong, H. T., & Rattanarojpong, T. (2019). Blood and Liver Biopsy for the Non-Destructive Screening of Tilapia Lake Virus. *Journal of Fish Diseases*, 42(11), 1629-1636. <https://doi.org/10.1111/jfd.13076>
- Christi, N. P. (2015). Distribusi dan Analisis Filogenetik RNA *Nervous Necrotic* pada Benih Nila (*Oreochromis* sp.). *Tesis*. Universitas Brawijaya.
- Dong, H. T., Ataguba, G. A., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., & Senapin, S. (2017). Evidence of TiLV Infection in Tilapia Hatcheries in Thailand from 2012 to 2017 Reveals Probable Global Spread of the Disease. *Aquaculture*, 479(1), 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.035>
- Dong, H. T., Siriroob, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., Vanichviriyakit, R., & Senapin, S. (2017). Emergence of Tilapia Lake Virus in Thailand and an Alternative Semi-Nested RT-PCR for Detection. *Aquaculture*, 476(1), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.019>
- Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, J. E. K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., Lev, M., Hurvitz, A., Galeotti, M., Bacharach, E., & Eldar, A. (2014). Identification of a Novel RNA Virus Lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4137-4146. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>
- Fathi, M., Dickson, C., Dickson, M., Leschen, W., Baily, J., Muir, F., Ulrich, K., & Weidmann, M. (2017). Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile Tilapia Affected by 'Summer Mortality' Syndrome. *Aquaculture*, 473(1), 430-432. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.014>
- Ferguson, H. W., Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J. A., & del Pozo, J. (2014). Syncytial Hepatitis of Farmed Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L): A Case Report. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 583-589. <https://doi.org/10.1111/jfd.12142>
- Ke, F., & Zhang, Q. (2023). Genomics Advances on Genomes Studies of Large



- DNA Viruses in Aquaculture : A Minireview. *Genomics*, 115(6), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2023.110720>
- Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. (2020). *Target dan Progam Prioritas Perikanan Budidaya Tahun 2021*. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.
- Keputusan Kepala Badan Karantina Ikan, Pengendalian Mutu, dan Keamanan Hasil Perikanan Nomor 65 Tahun 2021 tentang Pedoman Pemantauan Penyakit Ikan Karantina*. 2021. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.
- Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 17 Tahun 2021 tentang Penetapan Jenis Penyakit Ikan Karantina, Organisme Penyebab, Golongan, dan Media Pembawa*. 2021. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia.
- Koesharyani, I., Gardenia, L., Widowati, Z., Khumaira., & Rustianti, D. (2018). Studi Kasus Infeksi Tilapia Lake Virus (TiLV) pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1), 85-92. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.13.1.2018.85-92>
- Mugimba, K. K., Lamkhannat, M., Dubey, S., Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2020). Tilapia Lake Virus Downplays Innate Immune Responses During Early Stage of Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73781-y>
- Nuryanto, A., Amalia, G., Khairani, D., Pramono, H., & Bhagawati, D. (2018). Molecular Characterization of Four Giant Gourami Strains from Java and Sumatra. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 19(2), 578-584. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d190228>
- Rakus, K., Mojzesz, M., Widziolek, M., Pooranachandran, N., Teitge, F., Surachetpong, W., Chadzinska, M., Steinhagen, D., & Adamek, M. (2020). Antiviral Response of Adult Zebrafish (*Danio rerio*) during Tilapia Lake Virus (TiLV) Infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 101(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.040>
- Saragih, M. S., & Junaidi. (2021). Deteksi Penyakit TiLV (*Tilapia Lake Virus*) pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Metode RT-PCR di Balai KIPM Medan I. *Jurnal Perikanan*, 11(2), 186-194. <https://doi.org/10.29303/jp.v11i2.254>
- Sarjito., Prayitno, S. B., & Haditomo, A. H. C. (2013). *Parasit dan Penyakit Ikan*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Shao, W., Li, X., Goraya, M. U., Wang, S., & Chen, J. L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Surachetpong, W., Roy, S. R. K., & Nicholson, P. (2020). Tilapia Lake Virus: The Story so Far. *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1115-1132. <https://doi.org/10.1111/jfd.13237>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>



- Tang, K. F. J., Bondad-Reantaso, M. G., Surachetpong, W., Dong, H. T., Fejzic, N., Wang, Q., Wajsbrot, N., & Hao, B. (2021). *Tilapia Lake Virus Disease Strategy Manual*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Tattiyapong, P., Sirikanchana, K., & Surachetpong, W. (2018). Development and Validation of a Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction for Tilapia Lake Virus Detection in Clinical Samples and Experimentally Challenged Fish. *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 255-261. <https://doi.org/10.1111/jfd.12708>
- Wahidi, B. R. (2014). Analisis Filogenetik Gen Thymidin Kinase Koi Herpesvirus (KHV) Beberapa Ikan Air Tawar pada Sentra Budidaya di Jawa Timur. *Jurnal Sain Veteriner*, 32(1), 130-145.
- Warmadewi, D. A. (2017). *Buku Ajar : Mutasi Genetik*. Denpasar: Universitas Udayana .
- Widziolek, M., Janik, K., Mojzesz, M., Pooranachandran, N., Adamek, M., Pecio, A., Surachetpong, W., Levraud, J. P., Boudinot, P., Chadzinska, M., & Rakus, K. (2021). Type I Interferon-Dependent Response of Zebrafish Larvae During Tilapia Lake Virus (TiLV) Infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 116(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103936>
- WOAH. (2022). *Infection with Tilapia Lake Virus (TiLV) : A Novel Orthomyxo-Like Virus*. Paris: World Organisation for Health Animal Health.
- Yamkasem, J., Tattiyapong, P., Kamlangdee, A., & Surachetpong, W. (2019). Evidence of Potential Vertical Transmission of Tilapia Lake Virus. *Journal of Fish Diseases*, 42(9), 1293-1300. <https://doi.org/10.1111/jfd.13050>