

KORELASI GENOTIP ALLOZYME DAN FRAGMEN MT-DNA TERHADAP INFEKSI VIRAL NERVOUS NECROSIS (VNN) PADA KERAPU BEBEK, *Cromileptes altivelis*

Sari Budi Moria Sembiring^{*)}, Haryanti^{*)}, I Gusti Ngurah Permana^{*)}, Ketut Mahardika^{*)}, dan Ketut Sugama^{**)}

ABSTRAK

Analisis allozim dan mt-DNA dilakukan pada kerapu bebek, *C. altivelis* untuk mengetahui korelasi antara sifat genotip dan ketahanan terhadap infeksi VNN yang dapat dijadikan indikator seleksi perbaikan mutu genetik. Deteksi VNN dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik F2 dan R3. Amplifikasi PCR dengan primer universal menghasilkan pita tunggal dengan ukuran fragmen 426—1.500 *base pairs* (bp). Pemotongan dengan enzim restriksi khususnya *Hinf* I menunjukkan bahwa antara ikan yang sehat dan terinfeksi VNN terdapat perbedaan heterosigositas. Demikian juga hasil analisis protein dengan allozim elektroforesis. Pada ikan yang *recovery* dan *moribund* mempunyai nilai heterosigositas yang sama (1.000), sedangkan pada ikan yang mati nilai heterosigositasnya lebih rendah (0,943). Enzim restriksi *Hinf* I dapat digunakan sebagai penciri gen dalam resistensi terhadap VNN pada kerapu bebek.

ABSTRACT: *Genetic correlation of allozyme genotype and mt-DNA fragment on Nervous Necrosis Virus infection of humpback grouper, Cromileptes altivelis. By: Sari Budi Moria Sembiring, Haryanti, I Gusti Ngurah Permana, Ketut Mahardika, dan Ketut Sugama*

Allozyme and mt-DNA analysis were conducted on humpback grouper, C. altivelis to find relationship between genotype and resistance on Nervous Necrosis Virus infection as indication for genetic selection program. VNN detection by RT-PCR using specific primer F2 and R3. PCR amplification of mt-DNA genome using universal primer produced single band with fragment size of 426—1,500 base pair. Digestion with restriction enzyme of Hinf I showed that heterozygosity on Nervous Necrosis Virus infected fish was different compared to healthy fish. The same results were found on allozyme electrophoresis analysis. On recovery and moribund fish were found the same heterozygosity value (1,000) while on death fish was lower (0.943). Restriction enzyme Hinf I can be applied as gene marker for VNN resistance on humpback grouper.

KEYWORDS: *allozyme, mt-DNA, viral nervous necrosis, humpback grouper, Cromileptes altivelis*

PENDAHULUAN

Virus yang dikenal dengan nama Viral Nervous Necrosis (VNN) umumnya menyerang stadia larva dan yuwana ikan kerapu merupakan penyebab utama mortalitas (Munday & Owens, 1998; Koesharyani *et al.*, 1999). Virus ini menyerang retina mata dan otak, melalui irisan histologi kerusakan jaringan tersebut dapat dilihat adanya vakuolasi (Munday & Owens, 1998; Zafran *et al.*, 1998; Arimoto *et al.*, 1993). Hingga saat ini belum ada cara penanggulangan virus ini dan upaya yang sering dilakukan adalah pencegahan secara dini melalui penggunaan induk, telur, dan larva yang bebas virus, manajemen lingkungan yang baik, menghindari stres, dan memberikan pakan yang

bermutu baik dan berkecukupan (Kawahara *et al.*, 2000).

Setelah dikembangkannya teknik yang dapat mendeteksi polimorfisme protein dengan elektroforesis pada ikan, membuka peluang berbagai macam studi di antaranya adalah hubungan genotip dengan sifat ketahanan ikan terhadap berbagai serangan penyakit (Chevassus & Dorson, 1990). Chevassus & Dorson (1990) juga mengemukakan bahwa ikan dengan genotip AA, AC, CC pada transferin (Tf lokus) mempunyai ketahanan yang berbeda terhadap serangan infeksi bakteri pada organ ginjal dan individu ikan dengan genotip CC paling tahan penyakit. Amand & Nelson (1997) menyatakan bahwa terdapat

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

^{**)} Pusat Riset Perikanan Budidaya

perbedaan ketahanan terhadap serangan virus *Infectious Haematopoietic Necrosis* (IHN) pada masing-masing individu ikan dan sangat dipengaruhi genotip masing-masing individu. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang polimorfisme protein pada ikan kerapu bebek ternyata terdapat tiga lokus polimorfik yaitu ADH (Alcohol Dehydrogenase), IDH (Isocitrate Dehydrogenase), dan GPI (Glucosephosphate Isomerase) (Sugama *et al.*, 2000).

Dalam rangka mengetahui peran polimorfisme genotip terhadap resistensi infeksi penyakit maka dilakukan penelitian korelasi antara keragaman genetik dan genotip dengan ketahanan terhadap virus VNN melalui analisis allozim dan mt-DNA. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat mengetahui penciri gen untuk dijadikan indikator dalam seleksi genetik terhadap ketahanan penyakit VNN pada kerapu bebek, *C. altivelis*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan yuwana ikan kerapu bebek, *C. altivelis* yang berasal dari 2 (dua) turunan atau lot dengan umur 2 bulan (panjang rata-rata 3 cm). Sebanyak 20 ekor ikan sehat dari masing-masing lot diinfeksi dengan virus VNN melalui perendaman selama 24 jam pada konsentrasi 0,1 mL/mL air laut dengan 3 kali ulangan. Setelah 4—5 hari masa pemeliharaan dilakukan penghitungan jumlah ikan yang mati, hampir mati, dan ikan yang sehat. Masing-masing individu ikan yang mati, *moribund* (hampir mati), dan sehat dianalisis dengan allozim dan mt-DNA untuk mengetahui genotipnya.

Pembuatan Inokulum Virus

Yuwana kerapu bebek umur 3 bulan yang terserang VNN secara alami diambil bagian organ mata dan otak sebanyak 20 g, kemudian digerus dan ditambahkan 200 mL larutan 10 mM *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,2; selanjutnya disentrifugasi 3.000 rpm selama 30 menit. Supernatannya disaring dengan membran filter (0,45 mm) dan digunakan sebagai sumber inokulum untuk uji tantang (Arimoto *et al.*, 1993).

Deteksi VNN dengan RT-PCR

Mata dan otak dari ikan uji yang mati dan yang masih hidup pada sampling terakhir, masing-masing dimasukkan ke dalam *ependorf tube* steril dengan gunting dan pinset steril berbeda. Metode deteksi virus digunakan RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Ekstraksi RNA menggunakan isogen (Iwamoto *et al.*, 1999). Aplikasi atau penggandaan cDNA VNN menggunakan primer universal yaitu F2 (CgTgTCAgTCATgTgTCgCT) dan R3

(CgAgTCAACACgggTgAAgA). Primer tersebut merupakan hasil *sequencing* dari *Striped Jack Nervous Necrosis Virus* (SJNNV), pada T-4 dengan target molekul 426 bp. (Nishizawa *et al.*, 1994). Hasil amplikasi RT-PCR selanjutnya dielektroforesis pada 1,5% agarose gel selama 25 menit dalam TAE *buffer* dan diwarnai dengan ethidium bromide selama 10—15 menit. Pembacaan hasil dilakukan dengan UV transilluminator dan difoto sebagai dokumentasi menggunakan polaroid gel kamera.

Ekstraksi dan Purifikasi mt-DNA

Untuk mendapatkan genome mt-DNA dilakukan ekstraksi dengan mengikuti modifikasi metode Ovenden (2000). Daging dihancurkan dalam 500 mL larutan 10% Chelex-100 yang dimasukkan dalam *ependorf tube* dan ditambahkan 5 mL proteinase kinase (10 mg/mL) dan dipanaskan 55°C dalam *water bath* selama 3—4 jam. Selanjutnya larutan ini dipanaskan lagi pada suhu 89°C selama 8 menit, dan didinginkan pada suhu kamar hingga dingin sebelum ditambahkan 55 mL TE (Tris-EDTA) *buffer* pH 8,0. Genome mt-DNA dapat diperoleh dengan cara mensentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan pada lapisan atas dan berwarna jernih merupakan genome mt-DNA dan dipindahkan ke dalam *ependorf tube* baru dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis lebih lanjut.

Amplifikasi PCR Genome mt-DNA

Amplifikasi PCR terhadap genome mt-DNA sampel kerapu bebek dari masing-masing turunan/lot diawali dengan mencampurkan beberapa reagent PCR Kit (Qiagent) yang terdiri atas 10xPCR *buffer*; 2,5 mM DNTP mix; Primer MT1 dan MT2 (10 mM); 0,5 U Tag polymerase; aquades dan genome mt-DNA dalam PCR tube 0,2 mL; dan diinkubasi dalam mesin PCR (Corbett Research PC-960) dengan 33 cycle. Dalam amplifikasi ini digunakan suhu denaturasi awal dan akhir masing-masing 94°C selama 1 menit, suhu *annealing* 45°C selama 1 menit dan suhu ekstensi awal 72°C selama 1 menit serta suhu ekstensi akhir 72°C selama 7 menit. Primer universal MT1 dan MT2 yang digunakan dalam amplifikasi mt-DNA kerapu bebek mempunyai *sequencing* 5'-CATATTAAACCCGAATGATATTT-3' dan 5'-ATAATAGGGTATCTAATCCT AGTTT-3'. Untuk mengetahui pola pita tunggal yang dihasilkan dari amplifikasi mt-DNA, maka digunakan 1% agarose gel elektroforesis dalam 1xTBE (Tris Boric Acid EDTA) *buffer* selama 30 menit. Sebagai molekul marker digunakan DNA ladder 100 bp dan I Hind-III, sedangkan untuk pewarnaan digunakan ethidium bromide dengan cara perendaman selama 20 menit. Hasil yang diperoleh diamati di bawah UV transilluminator dan didokumentasikan dengan gel kamera.

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Untuk mengetahui polimorfisme dan marker enzim restriksi, *template* mt-DNA produk amplifikasi PCR dipotong dengan enzim restriksi EcoR V (GAT'ATC), *Hinf* I (G'ANTC) dan *Hae* III (GG'CC). Pemotongan *template* DNA diawali dengan menyiapkan larutan 10 x *buffer*, 100 x BSA, enzim restriksi dan aquades serta *template* mt-DNA produk amplifikasi PCR dengan konsentrasi tertentu. Selanjutnya diinkubasi dalam *water bath* dengan suhu 37°C selama 3 jam. Dengan menggunakan 1,5% agarose gel dalam 1xTBE *buffer* dan dielektroforesis 35 menit serta pewarnaan dengan ethidium bromide selama 15 menit, maka akan diperoleh panjang fragmen dari masing-masing *template* DNA. Sebagai molekuler marker digunakan DNA ladder 100 bp dan *I Hind* III, sedangkan kontrol positif digunakan *template* mt-DNA yang tidak mengalami pemotongan. Hasil yang diperoleh diamati di bawah UV transilluminator dan didokumentasikan dengan gel kamera. Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi persentase kematian ikan setelah diinfeksi VNN, persentase polimorfik loci, hubungan antara ikan sehat dengan genotip pada polimorfik loci dan model genotip ikan yang resisten dan sensitif terhadap infeksi VNN.

Analisis Allozim Elektroforesis

Untuk pembuatan gel elektroforesis digunakan potatoes agar (S-4501), MgCl₂ 1M, KCN 0,1 N, Tris Citric Acid buffer pH-8 (TC-8), dan Citric Acid-Aminopropyl-morpholine pH-7 (CAPM-7), acetic acid 7%, fast blue marker. Sedangkan enzim yang diamati sebanyak 11 enzim dari kelompok NAD (Nicotinamide-adenine dinucleotide), di antaranya ADH (Alcohol dehydrogenase), MDH (Malate dehydrogenase), aGPD (a-Glycerolphosphate dehydrogenase), LDH (Lactate dehydrogenase), sedangkan dari kelompok NAD-P (Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) adalah IDH (Isocitrate dehydrogenase), 6-PGD (6-phosphogluconate dehydrogenase), ME (Malic en-

zyme), GPI (Glucose phosphate isomerase), PGM (Phosphoglucumutase), serta SP (Sarcoplasmic protein), EST (Esterase). Metode analisis mengikuti prosedur Sugama (1991) dan staining prosedur mengikuti metode dari Shaw & Prasad (1970).

HASIL DAN BAHASAN

Dari hasil pengamatan sintasan kerapu bebek, *C. altivelis* yang mengalami penyehatan kembali (*recovery*), *moribund* (hampir mati), dan mati setelah diinfeksi dengan VNN melalui perendaman pada konsentrasi 0,1 mL/mL air laut terlihat pada Tabel 1.

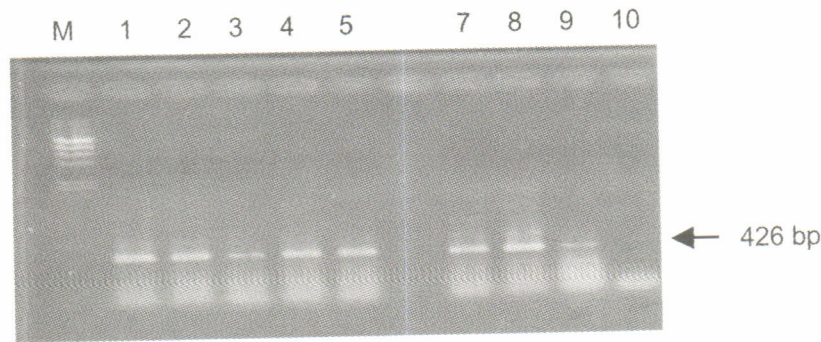
Gejala yang umum ditemukan pada kasus infeksi VNN yuwana kerapu bebek adalah tingkah laku berenang yang tidak normal seperti berenang dengan gerakan tidak terarah atau diam di dasar wadah pemeliharaan serta nafsu makan menurun secara drastis yang selanjutnya disertai dengan kematian massal, karena virus ini menyerang sistem syaraf pada mata dan otak.

Hasil analisis yuwana kerapu bebek sebelum dan sesudah diinfeksi VNN dengan metode RT-PCR (Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction) menunjukkan bahwa amplifikasi menggunakan primer R3 dan F2 menghasilkan berat molekul 426 bp. Dari semua sampel sebelum diinfeksi dengan VNN menunjukkan kondisi negatif dari infeksi. Namun setelah diinfeksi VNN, baik yuwana kerapu bebek yang hampir mati maupun yang mengalami mortalitas menunjukkan hasil positif terinfeksi VNN (Gambar 1).

Untuk mengetahui variasi genotip dari hewan uji yang sehat (belum diinfeksi VNN), yang mengalami penyehatan kembali (*recovery*), *moribund*, dan yang sudah mati maka dilakukan analisis mt-DNA dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dan analisis protein dengan allozim elektroforesis. Hasil amplifikasi PCR ikan kerapu bebek yang tidak diinfeksi dan yang diinfeksi VNN tidak ada perbedaan berat molekul fragment DNA yaitu 1.500 bp (Gambar 2).

Tabel 1. Sintasan rata-rata yuwana kerapu bebek, *C. altivelis* yang diinfeksi dengan VNN melalui perendaman pada konsentrasi 0,1 mL/mL air laut (1 jam) dan dipelihara selama 5 hari
Table 1. Mean survival rate of humpback grouper juvenile after infected by VNN at concentration of 10⁻¹ and reared for 5 days

Hewan uji <i>Fish tested</i>	Jumlah ikan (ind./bak) <i>Number of fishes (ind./tank)</i>	Rata-rata sintasan (%) dan standar deviasi <i>Mean survival rate (%) and standard deviation</i>		
		Penyehatan kembali <i>Recovery</i>	Hampir mati <i>Moribund</i>	Mati <i>Mortality</i>
Lot I	20	8 (40%) ± 1.732	4 (20%) ± 1.0	8 (40%) ± 1.0
Lot II	20	4 (20%) ± 1.0	3 (15%) ± 1.0	13 (65%) ± 1.732



Gambar 1. Hasil deteksi infeksi VNN dengan RT-PCR pada *C. altivelis* sesudah diinfeksi VNN melalui perendaman pada konsentrasi 0,1 mL/mL air laut. (M: Marker I *Hind* III; 1,2,3,4,5 yuwana hidup setelah diinfeksi dengan VNN; 7,8 yuwana mati setelah diinfeksi dengan VNN; 9 kontrol positif; 10: kontrol negatif)

Figure 1. VNN detection of *C. altivelis* with RT-PCR method after infected artificially by immersion using VNN with concentration of 10^{-1} mL (M: Marker I *Hind* III; 1,2,3,4,5 live juvenile after infected with VNN; 7,8 death juvenile after infected with VNN; 9: positive control; 10: negative control)



Gambar 2. Amplifikasi PCR dari mt-DNA kerapu bebek, *C. altivelis* yang terinfeksi VNN (M1; Marker *Hind* III; M2; Marker 100 bp ladder)

Figure 2. PCR amplification of mt-DNA of humpback grouper, *C. altivelis* infected by VNN (M1; Marker I *Hind* III; M2; Marker 100 bp ladder)

Ukuran fragment mt-DNA kerapu bebek yang telah dipotong dengan 3 enzim restriksi tertera pada Tabel 2. Polymorfisme panjang fragment restriksi diamati dengan *Ecor*V, *Hae* III, dan *Hinf*I yang masing-masing dapat memotong 2 dan 3 basa endonukleosis untuk hewan uji yang sehat (Gambar 3), namun pada ikan yang terinfeksi dengan VNN ternyata panjang fragment restriksi hanya dapat memotong 2 basa endonukleosis (Gambar 4).

Berdasarkan hal tersebut di atas terlihat bahwa ada perbedaan genotip antara ikan yang sehat dan ikan hampir mati (*moribund*) khususnya pada lokus hasil pemotongan dengan restriksi enzim *Hinf*I dan *Hae* III (Tabel 2). Nampaknya keragaman gen pada yuwana ikan yang sehat relatif lebih variatif bila dibandingkan dengan ikan yang sakit oleh infeksi VNN. Secara genetika sangat dimungkinkan bahwa ikan dengan variasi gen yang tinggi akan menunjukkan keragaman yang lebih baik dibandingkan dengan ikan yang variasi gennya rendah.

Pengamatan terhadap allele frekuensi dan heterozygositas yang telah dihitung dari polymorphic loci hasil pemotongan mt-DNA terhadap ikan kerapu bebek, *C. altivelis* ada perbedaan genetik antara ikan yang *recovery*, *moribund*, dan mati. Hal ini ditunjukkan dari penciri enzim restriksi *Hinf*I yang sangat berbeda nyata dengan marker *Ecor*V dan *Hae* III (Tabel 3). Pada tabel tersebut terlihat bahwa heterosigositas benih untuk masing-masing lot dengan menggunakan enzim restriksi *Ecor*V dan *Hae* III mempunyai nilai 0 (nol), sedang yang menggunakan enzim restriksi *Hinf*I nilai heterosigositasnya 0,718. Dari pengamatan tersebut, nampaknya penciri enzim restriksi *Hinf*I dapat dijadikan penciri gen untuk ketahanan penyakit VNN pada ikan kerapu bebek.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hubungan genetik yang digambarkan dengan *Nei's distance* ikan kerapu yang terserang VNN dan mati secara genetik sangat berbeda variasi gennya dengan ikan yang terserang VNN, namun masih bertahan hidup (Tabel 4).

Tabel 2. Ukuran fragmen mt-DNA kerapu bebek, *C. altivelis* yang dipotong dengan 3 enzim restriksi (EcoR V, Hae III, Hinf I)

Table 2. Fragment size of humpback grouper, *C. altivelis* mt-DNA digested with 3 restriction enzyme

Enzim restriksi <i>Restriction enzyme</i>	Individu <i>Lots</i>	Ukuran fragmen (<i>Fragment size</i>)		
		1	2	3
EcoR V	Lot I			
	- Infected recovery (8)	250	1,250	-
	- Infected moribund (4)	800	-	-
	- Infected death (8)	800	-	-
	Lot II			
	- Infected recovery (4)	800	-	-
	- Infected moribund (3)	800	-	-
	- Infected death (13)	800	-	-
Hae III	Lot I			
	- Infected recovery (8)	250	500	750
	- Infected moribund (4)	300	1,200	-
	- Infected death (8)	300	1,200	-
	Lot II			
	- Infected recovery (4)	250	500	750
	- Infected moribund (3)	275	500	-
	- Infected death (13)	275	500	-
Hinf I	Lot I			
	- Infected recovery (8)	150	250	1,100
	- Infected moribund	350	1,150	-
	- Infected death (8)	350	1,150	-
	Lot II			
	- Infected recovery (4)	150	250	1,100
	- Infected moribund (3)	350	1,150	-
	- Infected death (13)	350	1,150	-

Tabel 3. Frekuensi alel dan heterosigositas polimorfik pada kerapu bebek, *C. altivelis* yang terinfeksi VNN
Table 3. Allel frequency and polymorphic heterogosity of humpback grouper, *C. altivelis* after being infected by VNN

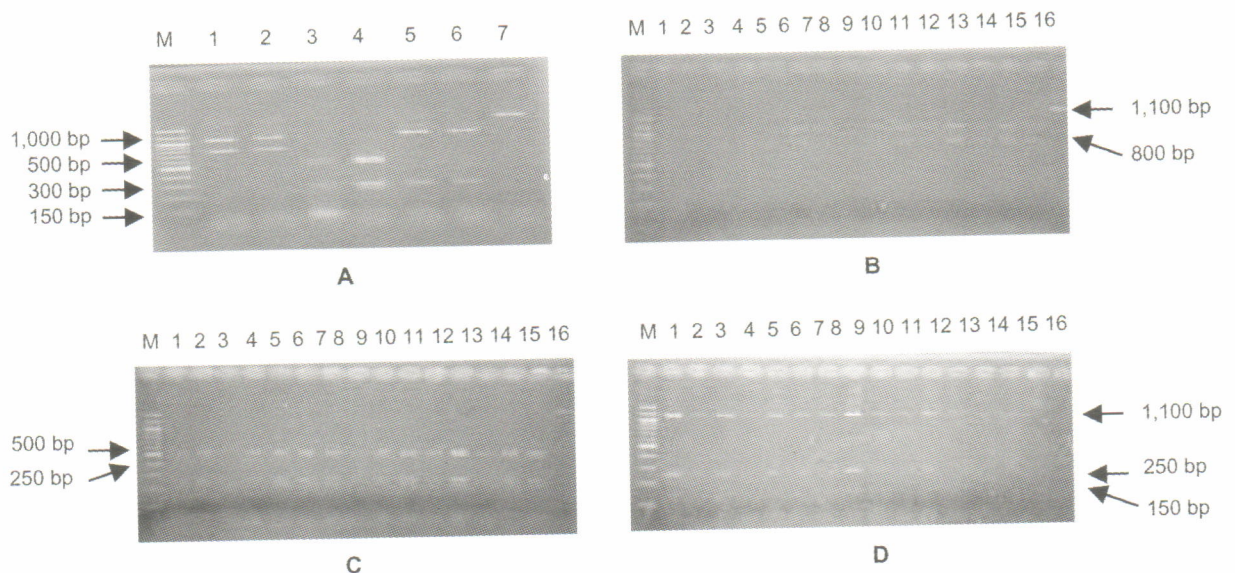
Lokus <i>Allel</i>	Frekuensi alel <i>Allel frequency</i>	Heterosigositas <i>Heterosigosity</i>
Ecor V		0.00
Lot I	1.0	
Lot II	1.0	
Hae III		0.00
Lot I	1.0	
Lot II	1.0	
Hinf I		0.718
Lot I	0.336	
Lot II	0.15	

Hasil analisis allozim elektroforesis terdapat 3 kerapu bebek, *C. altivelis*, yaitu: IDH, GPI, dan ADH enzim yang dapat memberikan polimorfik pada yuwana (Gambar 5).



Gambar 3. Pola polimorfisme mt-DNA ikan kerapu bebek, *C. altivelis* sebelum diinfeksi VNN dan dipotong dengan restriksi enzim *EcoR* V, *Hae* III, *Hinf* I. M: DNA ladder 100 bp; A (ikan sehat lot I, 1-6: *Hae* III, 7: tanpa pemotongan); B (ikan sehat lot I, 1-10: *Hae* III, 11: tanpa pemotongan); C (ikan sehat lot II, 1-5: *EcoR* V, 6-10: *Hinf* I, dan 11-15: *Hae* III, 16: tanpa pemotongan)

Figure 3. mt-DNA polymorphism pattern of humpback grouper, *C. altivelis* before VNN infected and digested with *EcoR* V, *Hae* III, *Hinf* I restriction enzyme. M: DNA ladder 100 bp. A (healthy fish from lot I, 1-6: *Hae* III, 7: undigested); B (healthy fish from lot I, 1-10: *Hae* III, 11: undigested); C (healthy fish from lot II, 1-5: *EcoR* V, 6-10: *Hinf* I, and 11-15: *Hae* III, and 16: undigested)

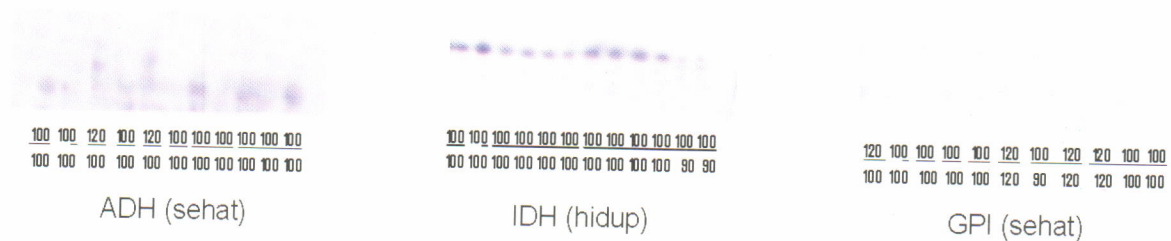


Gambar 4. Pola polimorfisme mt-DNA ikan kerapu bebek, *C. altivelis* yang diinfeksi VNN dan dipotong dengan enzim restriksi *EcoR* V, *Hae* III dan *Hinf* I. A (ikan mati dari lot I, 1-2: *EcoR* V, 3-4: *Hae* III, 5-6: *Hinf* I, 7: tanpa pemotongan); B (ikan mati dan ikan hampir mati lot II, 1-15: *EcoR* V, 16: tanpa pemotongan); C (ikan mati dan ikan hampir mati dari lot II, 1-15: *Hae* III, 16: tanpa pemotongan); D (ikan mati dan ikan hampir mati dari lot II, 1-15: *Hinf* I, 16: tanpa pemotongan).

Figure 4. mt-DNA polymorphism pattern of humpback grouper, *C. altivelis* infected with VNN and digested with *EcoR* V, *Hae* III and *Hinf* I restriction enzymes. A (dead fish with VNN infected from lot I, 1-2: *EcoR* V, 3-4: *Hae* III, 5-6: *Hinf* I, 7: undigested); B (Moribund and dead fish with VNN infected from lot II, 1-15: *EcoR* V, 16: undigested); C (Moribund and dead fish with VNN infected from lot II, 1-15: *Hae* III, 16: undigested); D (Moribund and dead fish with VNN infected from lot II, 1-15: *Hinf* I, 16: undigested).

Tabel 4. Jarak genetik Nei's antara kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* yang diinfeksi VNN pada 3 (tiga) lokus
 Table 4. Nei's genetic distance between humpback grouper, *Cromileptes altivelis* infected with VNN base on 3 loci examined

	Mati (Death)	Hidup (Life)
Mati (Death)	-	0.167
Hidup (Life)	-	-



Gambar 5. Pola pita elektroforesis lokus polimorfik (Idh, Adh, dan Gpi) pada kerapu bebek, *C. altivelis*
 Figure 5. Electrophoretic banding pattern of polymorphic loci (IDH, ADH, dan GPI) of Humpback grouper, *C. altivelis*

Pengamatan dengan analisis allozim nampak bahwa variabilitas genetik yuwana kerapu bebek, *C. altivelis* yang diinfeksi VNN terlihat tidak berbeda dengan hasil analisis mt-DNA. Hal ini terlihat dengan terjadinya perbedaan heterosigositas antara ikan yang bertahan hidup dan yang mati atau *moribund*. Hal ini diduga terdapatnya gen ketahanan terhadap penyakit pada ikan kerapu bebek yang masih hidup. Proses ekspresi gen pada ikan stadia larva/yuwana masih

belum banyak diketahui, hanya dimungkinkan adanya keterkaitan sifat antar gen polipeptida protein dalam susunan gen ikan, sehingga menimbulkan sifat resistensi terhadap penyakit (Tabel 5).

Ikan kerapu yang diinfeksi dengan VNN menunjukkan heterosigositas yang rendah. Hal ini dimungkinkan menyebabkan resistensi ikan tersebut menjadi rendah dan rentan terhadap serangan penyakit

Tabel 5. Variasi genetik ikan kerapu bebek, *C. altivelis* yang sehat, setelah diinfeksi VNN
 Table 5. Genetic variability of humpback grouper, *C. altivelis* after being infected by VNN

Parameter Item	Infeksi sehat kembali Infected recovery (H)	Infeksi hidup Infected moribund (I)	Infeksi mati Infected death (D)	Penurunan Reduction H-I (%)	Penurunan Reduction H-D (%)
Jumlah sampel Number of sample	20	20	20	-	-
Jumlah lokus Number of loci examined	15	15	15	-	-
Jumlah lokus polimorfik Number of polymorphic loci	3	3	2	0	0
Persentase lokus polimorfik Percentage polymorphic loci	0.2	0.2	0.13		
Jumlah alel per lokus Number of alel per locus	1.2	1.2	1.06	0	0
Heterosigositas Heterozygosity:					
- Teramati (Observed) (Ho)	0.032	0.032	0.023	0	28.12
- Harapan (Expected) (He)	0.032	0.032	0.018	0	9.43
- Ho/He	1.000	1.000	0.943	0	5.70

(VNN). Hasil penelitian ini diharapkan dapat merupakan acuan awal untuk mendukung *breeding program* di masa mendatang untuk perbaikan mutu genetik pada kerapu bebek, *C. altivelis*.

KESIMPULAN

Heterosigositas pada yuwana kerapu bebek yang sehat walaupun telah diinfeksi VNN (*infected recovery*) melalui perendaman dan ikan yang *moribund* menunjukkan nilai heterosigositas yang lebih tinggi (1.000) dibandingkan dengan ikan yang mati (*infected death*) dengan nilai heterosigositas 0,943 baik dari analisis Allozim maupun mt-DNA. Enzim restriksi *Hinf* I dapat digunakan sebagai penciri gen dalam resistensi terhadap VNN.

DAFTAR PUSTAKA

- Amand, D.F. and J.R. Nelson. 1997. Infectious hematopoietic necrosis: variation in the susceptibility of sockeye salmon to diseases. *J. Fish. Biol.*, 111: 567—573.
- Arimoto, M., K. Mori, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa. 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *J. Fish. Dis.*, 16: 461—469.
- Chevassus, B. and M. Dorson. 1990. Genetic resistance to diseases in fish. *Aquaculture*, 85: 83—107.
- Iwamoto, T.K. Mori, M. Arimoto, and T. Nakai. 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for Piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Organism.*, 39: 37—47.
- Kawahara, S., Trijoko, H. Setyadi, S. Ismi, and K. Sugama. 2000. Key to success in seed production of humpback groupers (*Cromileptes altivelis*). *News Letter JICA-ATA* 379.
- Koesharyani, I., Zafran, dan K. Yuasa. 1999. Deteksi viral nervous necrosis (VNN) menggunakan polymerase chain reaction (PCR) pada ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Desiminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*, Jakarta, p. 237—240.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29(3): 177—182.
- Munday, B.L. and L. Owens. 1998. Viral diseases of fish and shellfish in Australian mariculture. *Fish Pathology*, 33(4): 193—200.
- Nishizawa, T., K.I. Mori, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga. 1994. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of RNA of Striped Jack Viral Nervous Necrosis (SJVNN). *Dis. Aquat. Organism.*, 18: 103—107.
- Shaw, C.R. and R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. *Compilation of Recipes. Biochem. Gen.*, 4: 279—321.
- Sugama, K., Trijoko, S.B. Moria, Haryanti, and F. Cholik. 1999. Genetic variation and population structure of humpback groupers through out its range in Indonesian waters, *Ind. Fish. Res. J.* V(1): 32—38.
- Sugama, K. 1991. *Studies on Genetic Variation and Chromosome Set Manipulation in Red Sea Bream (Pagrus major)*. Thesis submitted to Ehime United Graduate School (Japan), 171 pp.
- Zafran, T. Harada, I. Koesharyani, K. Yuasa, and K. Hatai. 1998. Indonesian hatchery reared sea bass larvae (*Lates calcarifer*), associated with *Viral Nervous Necrosis* (VNN). *Ind. Fish. Res. J.* IV(1): 19—22.