

**Analisis Fragmen DNA Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)
yang Tahan dan Rentan terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus***

***Analysis of DNA Fragment Obtained from Groupers
(Epinephelus fuscoguttatus) Challenged by Vibrio alginolyticus***

St. Hidayah Triana
FPIK UMI Makassar

ABSTRACT

The objective of this study was to analyse the size of DNA fragment from both resistant and susceptible groupers (*Epinephelus fuscoguttatus*) after infection by *Vibrio alginolyticus*. This study was conducted by two steps, firstly, determination of Lethal Concentration (LC₅₀) of *Vibrio alginolyticus* to obtain fish which resistant and susceptible against *Vibrio alginolyticus* infection. Secondly, analysis of DNA fragment from both resistant and susceptible fish against *Vibrio alginolyticus* infection by PCR-RAPD method. In order to analyse the fragment of DNA from the fish, DNA was extracted and the concentration was counted using Kit. Sixteen primers were used, which six primers (RAPD 1-6) were from RAPD Kit, other primers were OPA-14, -A, -B, -C, and -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, and -457. The results demonstrated that the concentration of bacteria that caused 50 % of fish mortality (LC₅₀) was 7.4×10^5 CFU/L. Based on this concentration, the number of fish which were resistant and susceptible against *Vibrio alginolyticus* infection were obtained. For the DNA fragment analysis, the concentration of DNA after extraction ranges from 448 µg/ml to 3320 µg/ml with the purity ranges from 86-95 %. From 16 primers used for PCR-RAPD, only 6 primers showed DNA fragments in the gel electrophoresis. Those primers are OPA-14, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, and -457. The number of DNA fragments was higher in the group of resistant fish (average 6.4 fragments) than in the group of susceptible fish (average 4.9 fragments). Fifty seven percent (57%) from resistant fish showed specific DNA fragments with size 2.0 kb, indicate that these fragment sizes have a potential role to be used as a marker for obtaining the resistant fish against bacterial infection.

Keywords : Analysis of DNA fragment, *Epinephelus fuscoguttatus*, *Vibrio alginolyticus*, PCR RAPD

PENDAHULUAN

Ikan kerapu macan merupakan salah satu spesies kerapu dengan nilai ekonomi tinggi dan mempunyai prospek yang baik untuk dikembangkan sebagai ikan budidaya karena mempunyai harga jual yang cukup tinggi dan bernilai ekspor. Disamping merupakan komoditas perikanan laut yang bernilai tinggi dan menjadi salah satu komoditas unggulan di Indonesia, ikan ini juga mempunyai pertumbuhan yang cepat. Usaha budidaya ikan kerapu dianggap memiliki prospek yang cerah, karena didukung adanya teknologi pembenihan yang kini telah mulai dikuasai oleh para petani ikan ataupun nelayan.

Budidaya ikan kerapu terkendala adanya keterbatasan benih baik dalam kualitas, kuantitas, maupun kontinuitas. Akibat rendahnya sintasan pada pembenihan karena adanya infeksi bakteri patogen yang pada kondisi puncak wabah dapat menyebabkan

mortalitas sampai 100% (Murdjani 1997). Menurut Wijayati & Hamid (1997), bakteri yang mampu menyebabkan penyakit pada ikan kerapu (patogen) terdiri dari anggota spesies *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* dan *V. marinus*. Sedangkan menurut Khasonchandra (1999) bakteri *V. parahaemolyticus* dan *V. alginolyticus* adalah yang berperan sebagai penyebab kematian pada ikan laut hingga mencapai 80-90%.

Usaha pengendalian penyakit bakterial pada kegiatan budidaya ikan kerapu dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan atau antibiotik, pemberian vaksin (Kamiso *et al.* 2005) dan imunostimulan (Alifuddin 1999; Ilmiah *et al.* 2005) serta dengan menghasilkan strain ikan kerapu yang tahan terhadap serangan penyakit bakteri dalam hal ini *Vibrio alginolyticus*. Oleh karena itu, sebagai langkah awal telah dilakukan penelitian untuk mengetahui analisis profil DNA ikan kerapu macan yang diberi imunostimulan

Saccharomyces cerevisiae dan vaksin *Vibrio alginolyticus* (Triana *et al.* 2006). Penelitian lanjutannya adalah dengan melihat profil DNA ikan kerapu macan yang tahan dan rentan bakteri khususnya *Vibrio alginolyticus*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ukuran fragmen DNA ikan kerapu macan yang tahan dan rentan terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* yang dapat digunakan sebagai gambaran marker ikan kerapu macan tersebut. Dengan marker yang diperoleh ini diharapkan dapat membantu petani agar dapat dengan mudah menentukan ikan-ikan yang harus dipelihara untuk menghasilkan benih yang akan dibudidayakan dan dapat pula digunakan dalam program produksi ikan unggul.

METODE

Tempat dan waktu penelitian

Pemeliharaan ikan kerapu dan perlakuan dilakukan di Laboratorium Basah Balai Budidaya Air Payau Takalar mulai Juni hingga Agustus 2007, sedangkan untuk ekstraksi dan pengukuran konsentrasi DNA, PCR-RAPD serta elektroforesis dilakukan di Laboratorium Pengembangbiakan dan Genetika Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Bogor mulai September hingga Nopember 2007.

Bahan dan alat

Ikan yang digunakan adalah ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) yang diperoleh dari Balai Riset Budidaya Air Payau Takalar (Sul-Sel). Benih ikan dengan ukuran panjang antara 10 - 12 cm terlebih dahulu diadaptasikan selama satu bulan.

Pakan yang digunakan adalah pellet ikan yang diberikan secara *ad libitum*. Frekuensi pemberian pakan dilakukan tiga kali sehari.

Bakteri yang digunakan untuk ujiantang dalam penelitian ini adalah bakteri yang diperoleh dari Balai Riset Air Payau Takalar. Untuk keperluan ini, bakteri *V. alginolyticus* tersebut dibiakkan pada media agar TSA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode cawan tuang dinyatakan sebagai coloni forming unit (CFU). Adapun antigen bakteri untuk ujiantang disiapkan dengan biakan bakteri umur 24 jam.

Wadah yang digunakan dalam percobaan ini adalah ember plastik berkapasitas 80 liter sebanyak 12 buah yang dilengkapi dengan peralatan aerasi. Setiap wadah diisi sebanyak 10 ekor. Sebelum digunakan wadah tersebut terlebih dahulu disucihamakan. Wadah setiap perlakuan diisi dengan air yang disucihamakan dengan kaporit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) selama 24 jam, kemudian dinetralkan dengan

Natrium Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dan diaerasi kuat selama 24 jam.

Perlakuan

Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu, tahap pertama adalah uji pendahuluan mencari lethal dosis 50 untuk mendapatkan ikan tahan dan rentan terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* dan tahap kedua adalah uji utama untuk analisis fragmen DNA.

Tahap pertama meliputi uji pendahuluan yang terdiri konsentrasi bakteri 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 dan 10^6 CFU/ml. Dari ke lima konsentrasi tersebut terdapat tiga lethal konsentrasi yaitu 10^4 , 10^5 dan 10^6 CFU/ml. Selanjutnya dari ke tiga lethal konsentrasi tersebut dicari nilai LC_{50} sebagai uji akhir untuk mendapatkan ikan yang tahan dan rentan terhadap bakteri *V. alginolyticus*.

Penelitian utama terdiri atas dua perlakuan yaitu ikan yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*, setelah terlebih dahulu diinfeksi dengan bakteri tersebut sebanyak dosis LC_{50} dengan cara perendaman dengan lama perendaman 60 menit.

Pemeriksaan parameter

Parameter yang diamati meliputi ekstraksi dan pengukuran konsentrasi DNA, analisis PCR-RAPD dan elektroforesis serta sebagai data penunjang dilakukan pengukuran kualitas air.

Ekstraksi dan pengukuran konsentrasi DNA genom

Sirip ekor dari masing-masing 10 ekor ikan yang hidup dan yang mati setelah diuji tantang dengan bakteri patogen *V. alginolyticus* dipotong untuk ekstraksi DNA genom. DNA genom diekstraksi menggunakan kit (Puregene, Minneapolis, USA) sesuai dengan prosedur yang ada. Konsentrasi DNA diukur menggunakan mesin kuantifikasi DNA/RNA atau mesin Gene Quant. RNA/DNA Calculator, 80-2103-98, merk Pharmacia Biotech. Sebanyak 1 μl reaksi dielektroforesis menggunakan gel agarose 0,7%, DNA divisualisasi dengan etidium bromida yang disinari dengan UV. Foto diambil menggunakan kamera digital kemudian diproses menggunakan metode standar. Selanjutnya, tabung berisi DNA disimpan dalam freezer sampai digunakan untuk proses PCR.

Analisis PCR-RAPD

Pada tahap awal, 16 jenis primer diuji dalam proses PCR untuk mengetahui primer yang bisa digunakan untuk mengamplifikasi DNA ikan kerapu macan. Enam primer (RAPD 1-6) merupakan primer kit RAPD (RAPD Analysis Primers Sets, Amersham Pharmacia Biotech, Cat. no.: 27-9501-01), dan sisanya adalah primer OPA-14, primer-A, -B, -C, dan -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457. Tahap selanjutnya dipilih salah satu primer yang menghasilkan pita DNA dengan panjang bervariasi dan jelas terlihat. Amplifikasi PCR dilakukan

dengan volume reaksi 15 µl yang mengandung 1x *Ex Taq* Buffer, 200µM dNTP mix, *Ex Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) 0,125U, 1 µl DNA dan 1,5 µl primer. Sebanyak 5 µl reaksi dielektroforesis menggunakan gel agarose 0,7%, DNA divisualisasi dengan etidium bromida yang disinari dengan UV. Foto diambil menggunakan kamera digital dan kemudian diproses menggunakan metode standar.

Pengamatan kualitas air

Parameter kualitas air yang diukur meliputi suhu dengan menggunakan thermometer, salinitas dengan menggunakan refraktometer, amoniak dengan menggunakan spectrometer, pH dengan menggunakan pH meter dan DO dengan menggunakan DO meter yang dilakukan sebelum dan sesudah uji tantang pada setiap tahap pengamatan.

Analisis data

Perhitungan penentuan Lethal Dosis (LC₅₀) menggunakan analisis probit berdasarkan Bushine-Nash (Koestoni 1985). Untuk analisis fragmen DNA dilakukan dengan menjumlahkan pita DNA hasil amplifikasi PCR lalu dirata-ratakan dengan semua sampel dari masing-masing kelompok ikan yang hidup (T) dan yang rentan (M) setelah uji tantang dengan bakteri *V. alginolyticus*. Perbedaan jumlah rata-rata dan pola pita DNA hasil amplifikasi PCR dianalisis secara deskriptif. Analisis kualitas air juga dilakukan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Lethal Concentration 50 (LC₅₀)

Uji pendahuluan untuk mendapatkan LC₅₀ digunakan konsentrasi 10², 10³, 10⁴, 10⁵, dan 10⁶ CFU/L. Dari uji pendahuluan ini didapatkan tiga konsentrasi bakteri *V. alginolyticus* yang menyebabkan kematian yaitu 10⁴, 10⁵, dan 10⁶ CFU/L. Selanjutnya dari hasil uji ke tiga konsentrasi diperoleh data pada Tabel 1.

Hasil analisis probit dari data pada Tabel 1 tersebut diperoleh nilai LC₅₀ adalah 7,4×10⁵ CFU/L dengan metode perendaman selama 60 menit, yang selanjutnya diujikan pada ikan kerapu macan sejumlah 20 ekor.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dianalisis profil DNA ikan yang tahan (hidup) dan yang rentan (mati) masing-masing

sebanyak 7 ekor. Data tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

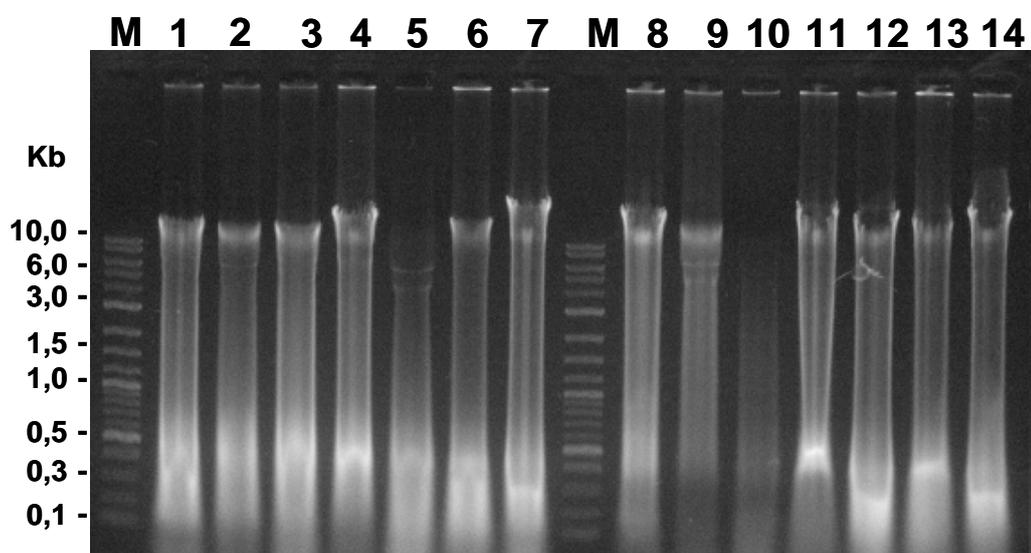
Tabel 1. Rata-rata respons ikan kerapu macan yang tahan (hidup) dan rentan (mati) setelah uji tantang.

Kepadatan Bakteri (CFU/L)	Respons		Ratio	% Kematian
	Mati	Hidup		
10 ⁶	5	5	5/10	50,00
10 ⁵	3	7	3/10	30,00
10 ⁴	2	8	2/10	20,00

Analisis fragmen DNA

Hasil ekstraksi DNA ikan kerapu macan yang tahan (hidup) dan yang rentan (mati) setelah uji tantang, masing-masing 7 ekor, ditunjukkan pada Gambar 1.

Visualisasi DNA pada gel agarose memperlihatkan memperlihatkan bahwa bentuk dan ukuran DNA total pada ikan yang tahan (kolom 1–7) dan rentan (kolom 8–14) hampir sama yaitu lebih dari 10 kb menunjukkan bahwa kemurnian pada semua perlakuan tidak jauh berbeda yaitu berkisar 86-95% (Tabel 2). Konsentrasi DNA hasil ekstraksi disamakan menjadi 488 µg/ml sebagai cetakan dalam proses PCR. Pada tahap awal, sampel DNA ikan kerapu yang tahan (hidup) dan rentan (mati) diuji dengan menggunakan 16 jenis primer. Jenis primer yang digunakan terdiri dari enam primer (RAPD 1-6) yang merupakan **primer kit RAPD** (RAPD Analysis Primers Sets, Amersham Pharmacia Biotech, Cat. no.: 27-9501-01), selebihnya menggunakan primer **OPA-14, primer-A, -B, -C, dan -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457** untuk mengetahui jenis primer yang menghasilkan jumlah pita DNA yang banyak dan jelas terlihat (Gambar 2). Hal ini didukung oleh pernyataan Hartana (2004) bahwa metode RAPD memerlukan penyeleksian primer acak yang memberikan hasil polimorfisme, yaitu pita RAPD yang dihasilkan lebih dari satu pita yang berbeda.

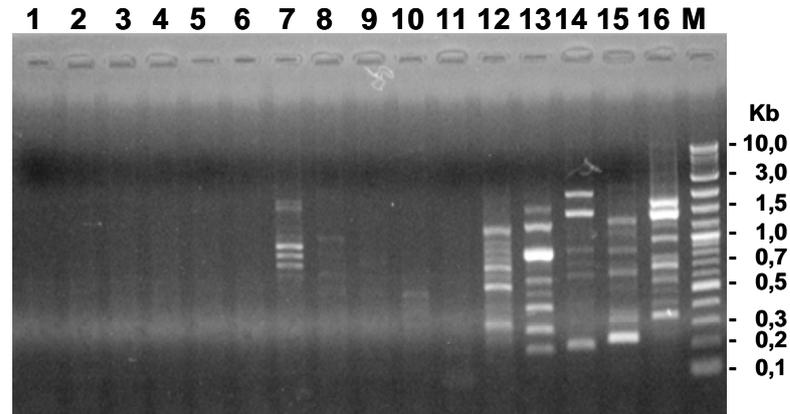


Gambar 1. Hasil elektroforesis ekstraksi DNA ikan kerapu macan yang tahan (no. 1-7) dan yang rentan (no. 8-14) setelah diuji tantang dengan bakteri *V. alginolyticus*. M: penanda dengan panjang DNA ditunjukkan di sebelah kiri gambar dalam unit kilobase (kb).

Tabel 2. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi ikan kerapu yang tahan (T) dan rentan (M) setelah diuji tantang dengan bakteri *V. alginolyticus*.

Kode sampel	[DNA] hasil pengukuran (µg/ml)	[DNA] hasil ekstraksi (µg/ml)*	Rasio	Kemurnian (%)
T1	21,7	868	1,823	91
T2	18,4	736	1,733	86
T3	12,2	488	1,904	95
T4	33,6	1344	1,868	93
T5	78,0	3120	1,818	90
T6	77,2	3088	1,734	86
T7	83,0	3320	1,825	91
M1	44,4	1776	1,830	91
M2	26,4	1056	1,788	89
M3	51,6	2064	1,818	90
M4	35,9	1436	1,830	91
M5	63,1	2524	1,725	86
M6	55,7	2228	1,792	89
M7	62,0	2480	1,835	91

Keterangan : *) Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dihitung dengan mengalikan konsentrasi DNA hasil pengukuran dengan faktor pengenceran yaitu 40.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA produk PCR-RAPD dengan menggunakan 16 jenis primer (no. 1-16) yang berbeda; M: penanda dengan panjang fragmen DNA ditunjukkan di sebelah kanan gambar dalam unit kilobase (kb).

Tabel 3. Sekuens DNA Primer yang menghasilkan pola pita DNA.

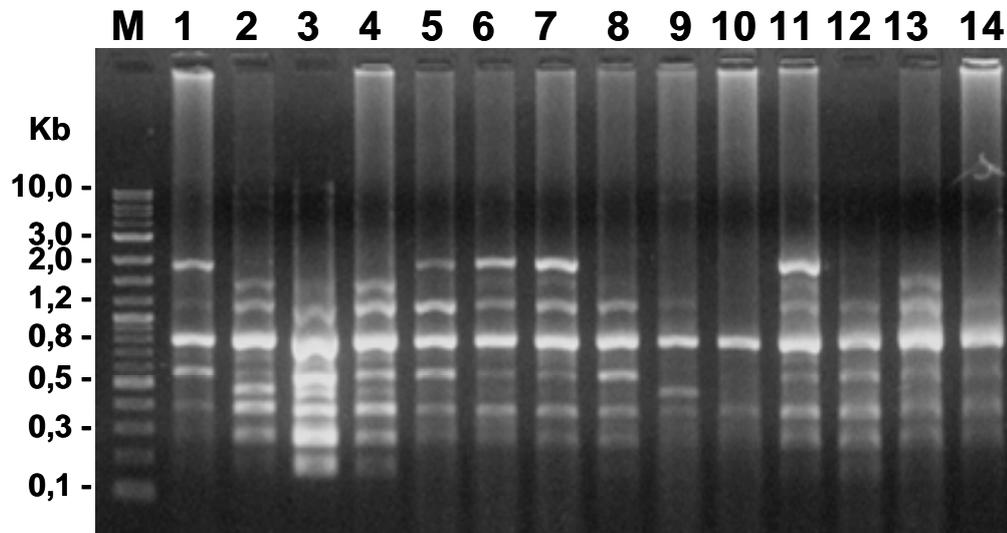
Jenis Primer	Sekuens DNA	Sumber Pustaka	Jumlah pita yang Dihasilkan	Letak pada lajur
OPA-14	TCT GTG CTG G	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	4	7
YNZ-22	CTC TGG GTG TCG TGC	Klinbunga <i>et al.</i> (2000)	4	12
UBC-122	GTA GAC GAG C	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	8	13
UBC-158	TAG CCG TGG C	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	5	14
UBC-456	GCG GAG GTC C	Klinbunga <i>et al.</i> (2000)	5	15
UBC-457	CGA CGC CCT G	Diaz <i>et al.</i> (2007)	6	16

Pada Gambar 2 terlihat bahwa tidak semua primer tersebut (kolom 1-6; 8-11) dapat melekat atau menempel ke DNA genom sehingga tidak semua proses PCR menghasilkan pita DNA. Hal ini dapat disebabkan karena antara primer-primer tersebut dengan DNA cetakan (*template DNA*) tidak komplementer diantara keduanya, karena apabila terdapat komplementer diantara keduanya maka primer akan menempel pada kedua utas DNA cetakan di situs (*sites*) yang berbeda. Kalau situs penempelan primer, yang berbeda ini, berada dalam jarak yang dapat diamplifikasi maka akan diperoleh produk PCR berupa pita DNA (Tingey *et al.* 1992; Sambrook *et al.* 1989). Hal ini didukung oleh Tingey *et al.* (1992) bahwa keberhasilan suatu primer mengamplifikasi DNA cetakan ditentukan oleh ada tidaknya homologi sekuens nukleotida primer dengan DNA cetakan. Selain itu, pada sampel yang memiliki pita DNA yang jelas terlihat (kolom no.7, 12-16) menunjukkan pola yang bervariasi antar primer, mengindikasikan spesifisitas sekuens

DNA tempat masing-masing primer tersebut melekat. Adapun sekuens daripada primer-primer tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada proses PCR selanjutnya untuk semua sampel digunakan primer **UBC-122** karena primer inilah yang menghasilkan pola pita yang sangat jelas dan paling banyak yaitu 8 pita DNA yang terang dengan ukuran 0,15; 0,25; 0,4; 0,45; 0,5; 0,8; 1,2 dan 1,5 kb (kolom no. 13 pada Gambar 2). Keberhasilan suatu primer mengamplifikasi DNA cetakan selain ditentukan oleh ada homologi sekuens nukleotida primer dengan DNA cetakan (Tingey *et al.* 1992), juga dipengaruhi oleh kemurnian dan banyaknya DNA yang mencukupi, konsentrasi $MgCl_2$ yang sesuai, banyaknya enzim Taq DNA polimerase yang cukup dan suhu pelekatan primer yang cocok (Anonim 2000 dalam Triana *et al.* 2007).

Hasil elektroforesis produk PCR menggunakan **primer UBC-122** untuk semua sampel ditunjukkan pada Gambar 3, sedangkan jumlah pita DNA yang dihasilkan masing-masing sample dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA produk PCR-RAPD ikan kerapu macan yang tahan/hidup (no. 1-7) dan yang rentan/mati (no. 8-14). Proses PCR menggunakan **primer UBC-122**. M: penanda dengan panjang fragmen DNA ditunjukkan di sebelah kiri gambar dalam unit kilobase (kb).

Tabel 4. Jumlah dan rata-rata pita DNA ikan kerapu macan yang tahan (T) dan rentan (M).

Kode Sample Ikan Tahan (T)	Jumlah Pita DNA	Kode Sampel Ikan Rentan (M)	Jumlah Pita DNA
T1	5	M1	5
T2	7	M2	4
T3	7	M3	2
T4	8	M4	7
T5	6	M5	5
T6	6	M6	6
T7	6	M7	5
Jumlah	45		34
Rata-rata	6,4		4,9

Pola pita DNA produk PCR pada grup ikan yang tahan (hidup) secara umum berbeda dengan yang rentan (mati) setelah uji tantangan. Jumlah pola pita DNA ikan kerapu macan yang tahan berkisar 5-8 buah, sedangkan ikan yang rentan berkisar 4-7. Adapun jumlah rata-rata pita DNA produk PCR dari ikan yang hidup 6,4 buah fragmen lebih besar daripada ikan yang mati 4,9 buah fragmen (Tabel 4). Hal ini menandakan bahwa polimorfisme DNA ikan kerapu macan yang tahan lebih besar daripada ikan yang rentan.

Menurut Warr (2003) makin besar keragaman suatu karakter individu atau populasi maka hal tersebut semakin baik (menguntungkan). Hasil lain memperlihatkan

bahwa persentase kelompok ikan hidup yang memiliki fragmen DNA spesifik dengan ukuran panjang 2 kb, yaitu 57% (4 sampel) lebih banyak daripada kelompok ikan yang mati ada satu sampel (14%). Kelompok ikan hidup yang memiliki pita DNA tersebut adalah pada lajur no. 1, 5, 6 dan no.7, sementara dari kelompok ikan yang mati adalah lajur no. 11. Dengan demikian, fragmen DNA tersebut berpeluang menjadi salah satu penanda (marker) bagi ikan kerapu macan resisten terhadap bakteri *V. alginolyticus*. yaitu dengan ukuran panjang fragmen 2,0 kb. Hal ini disebabkan ikan yang tahan memiliki peluang munculnya marker tersebut lebih sering (4 kali) dibandingkan dengan ikan yang rentan (hanya

sekali). Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lanjutan tentang marker spesifik ini agar hasil yang diperoleh lebih valid. Hasil penelitian Thaewnon-ngiw *et al.* (2005) menunjukkan bahwa kandidat marker spesifik dengan menggunakan primer UBC-122 didapatkan pada ikan *Barbodes* sp. dengan panjang fragmen sekitar 1200 bp. Sementara Thaewnon-ngiw *et al.* (2003), dengan menggunakan primer UBC-122 pada ikan *Pila angelica* mendapatkan marker spesifik ukuran 380 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa primer UBC-122 merupakan primer yang baik dalam mendapatkan marker spesifik pada beberapa jenis ikan. Aplikasi dari marker DNA dapat digunakan dalam konservasi keragaman genetik pada ikan budidaya (Taniguchi *et al.*, 2003) dan marker spesifik yang diperoleh dengan menggunakan primer tertentu pada setiap jenis ikan dapat digunakan pada program produksi ikan unggul.

Kualitas air

Rata-rata kualitas air yang diperoleh selama penelitian tertera pada Tabel 5. Secara umum kualitas air yang diperoleh masih berada dalam kisaran yang bisa ditolerir oleh ikan kerapu. Adanya filterisasi pada setiap penggantian air menyebabkan air yang digunakan bebas dari hama dan bakteri patogen khususnya *V. alginolyticus* sehingga diyakini bahwa ikan kerapu yang rentan (mati) murni disebabkan oleh hasil ujiantang bakteri *V. alginolyticus*.

Menurut Subyakto & Cahyaningsih (2003) kisaran kualitas air yang layak untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan ikan kerapu seperti suhu 28-32°C, salinitas 28-35 ppt, amoniak < 0,01 ppm dan oksigen terlarut

>3 ppm. Dengan demikian berdasarkan hasil pengukuran kualitas air, kisaran yang didapat masih layak untuk sintasan dan pertumbuhan ikan kerapu seperti suhu 28°C, salinitas 31 ppt, amoniak 0 ppm dan oksigen terlarut antara 3,06-3,07 ppm dan pH 7-8.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan beberapa hal diantaranya konsentrasi bakteri *V. alginolyticus* yang mematikan sebanyak 50 % (LC₅₀) ikan kerapu macan adalah $7,4 \times 10^5$ CFU/L. Terdapat perbedaan pola pita DNA produk amplifikasi PCR dengan metode RAPD antara ikan yang tahan dan yang rentan setelah ujiantang. Jumlah rata-rata pita DNA hasil amplifikasi PCR untuk ikan yang tahan 6,4 buah fragmen lebih tinggi dibandingkan pada ikan yang rentan 4,9 buah fragmen.

Sebanyak 57% dari ikan yang hidup memiliki pita DNA spesifik dengan ukuran panjang 2 kb, dan pita DNA tersebut berpotensi menjadi marker ikan kerapu macan yang tahan bakteri patogen. Kualitas air dalam kisaran layak untuk kelangsungan hidup ikan kerapu macan.

Ukuran fragmen 2 kb dengan menggunakan primer UBC-122 ini dapat digunakan untuk penelitian lanjutan yaitu untuk mencari induk ikan kerapu macan unggul yaitu ikan kerapu macan yang tahan terhadap *Vibrio alginolyticus* berdasarkan salah satu indikator berupa jumlah pola pita yang dihasilkan pada ikan kerapu macan yang tahan lebih beragam dibandingkan dengan ikan yang rentan.

Tabel 5. Rata-rata kualitas air ikan kerapu macan selama penelitian.

Konsentrasi bakteri (CFU/L)	Parameter (Satuan)				
	Suhu (°C)	Salinitas (0/00)	NH3 (ppm)	DO (ppm)	pH
Kontrol (A)	28	31	0	3,06	7
104	28	31	0	3,07	8
105	28	31	0	3,07	8
106	28	31	0	3,07	8

DAFTAR PUSTAKA

- Alifuddin M. 1999. *Peran Imunostimulan (Lipopolisakarida, Saccharomyces cereviceae dan Levamisol) pada Gambaran Respon Imunitas Ikan Jambal Siam (Pangasius hypophthalmus Fowler)*. Program Studi Ilmu Perairan. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Diaz FA, Souza AS & Molina WF. 2007. Lack of interpopulation genetic structure in the genus *stegastes* (Perciformes) with indication of local introgression. *Genetics and Molecular Research*. **6** (4): 1097-1106.
- Hartana A. 2004. *Penggunaan Teknik Molekular untuk Mengidentifikasi dan Melestarikan Keragaman Genetika Plasma Nutfah Tumbuhan. Dalam : Buku Panduan dan Kumpulan Modul Pelatihan Identifikasi Keragaman Hayati melalui Teknik molekular dalam Upaya Plasma Nutfah. Kerjasama antara Pusat studi Ilmu Hayati, LP2M IPB dengan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. Bogor.*
- Ilmiah, Triana SH, Ansyary H & Rantetondok A.. 2005. *Analisis Penggunaan Imunostimulan Afferm-3 (β -Glukan 25 %) dan Vaksin Vibrio alginolyticus Terhadap Sistem Imunitas Ikan Kerapu Macan (Epinephelus fuscoguttatus)*. [Laporan Penelitian Hibah Pekerti.DP2M Dikti].
- Kamiso HN, Isnansetyo A, Triyanto, Murdjani M. & Murwantoko. 2005. *Produksi Vaksin Vibrio untuk Mengatasi Penyakit Ikan Kerapu*. Makalah disampaikan pada Seminar Riset Unggulan Strategis Nasional (RUSNAS) Kerapu. 12 Agustus 2005. Jakarta.
- Kasonchandra J. 1999. *Major Viral Bakterial Diseases of Marine Fishes with Emphasions Seabass and Grooper*. Paper Contributed to the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Cebu International Convention Centre. Cebu City. Philipines.
- Khetpu K, Wongphayak S, Klinbunga S & Menasveta P. 2005. *Genetic Diversity and Species – Specific Markers of the Blue Swimming Crab Portunus pelagicus*. In : 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology 18-20 Oktober 2005.
- Klinbunga S, Boonyapakdee A & Pratoomchat B. 2000. Genetic Diversity and Species-Diagnostic Markers of Mud Crabs (Genus Scylla) in Eastern Thailand Determined by RAPD Analysis. *J. Mar. Biotechnol.* **2** : 180-187.
- Koestoni T. 1985. *Analisis Probit. Pendugaan LD50 dan LC 50 Serta Metode Perhitungannya*. Kelompok Peneliti Hama. Balai Penelitian Hortikultura Lembang. Lembang.
- Murjani M. 1997. *Pembenihan Ikan Kerapu Tikus (Cromileptes altivelis) dalam Bak Terkendali di Loka BBAP Situbondo*. Ditjen Perikanan, Deptan.
- Runtunuwu SD, Hartana A & Suharsono. 2004. *Teknik RAPD Kelapa dan Metode Ekstraksi DNA dan Kit PCR yang Berbeda. Dalam : Buku Panduan dan Kumpulan Modul Pelatihan Identifikasi Keragaman Hayati Melalui Teknik Molekuler Dalam Upaya Plasma Nutfah*. Pusat Studi Ilmu Hayati LP₂M IPB dengan DIKTI Depdiknas.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York; Cold Spring Harbour Laboratory.
- Subyakto S & Cahyaningsih S. 2003. *Pembenihan Kerapu Skala Rumah Tangga*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Taniguchi N, Perez ER & Nugroho E. 2003. *DNA markers as a tool for genetic management of brood stock for aquaculture. In : Aquatic genomics. Steps Toward a Great Future*. (N. Shimizu, T.Aoki, I. Hirono and F. Takashima). Springer-Verlag. Tokyo.
- Thaewnon-ngiw B, Klinbunga S, Phanwichien K, Sangduen N, Lauhacinda N & Menasveta P. 2003. Genetic diversity of introduced (*Pomacea caniculata*) and native (*Pila*) apple snails in Thailand revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *AJSTD* **20** (3 & 4) : 289-306.
- Thaewnon-ngiw B, Prakongruk N, Sangdee A & Petchjul K. 2005. *Genetic diversity of Barbodes genera employing RAPD technique*. In : 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology 18-20 Oktober 2005.
- Tingey SV, Rafalski JA & Williams JGK. 1992. *Genetic analysis with RAPD markers*. In : *Proceedings of the Symposium Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Minneapolis, 1 Nov 1992.
- Triana SH, Carman O, Alimuddin, Malina AC, Ilmiah & Gani MS. 2006. *Analisis Profil DNA Ikan Kerapu Macan (Epinephelus fuscoguttatus) yang Diberi Imunostimulan Saccharomyces cerevisiae dan Vaksin Vibrio alginolyticus*. [Laporan Penelitian Hibah Pekerti. DP2M Dikti.]
- Triana SH, Carman O, Alimuddin, Malina AC, Ilmiah & Gani MS. 2007. *Analisis Profil DNA Ikan Kerapu Macan (Epinephelus fuscoguttatus) yang Tahan dan Rentan terhadap Serangan Bakteri Vibrio alginolyticus*. [Laporan Penelitian Hibah Pekerti. DP2M Dikti].

- Warr G. 2003. *The impact of aquatic genomics on fish immunology. In : Aquatic genomics. Steps Toward a Great Future.* (N. Shimizu, T.Aoki, I. Hirono and F. Takashima). Springer-Verlag. Tokyo.
- Wijayati A & Hamid N. 1997. *Identifikasi Bakteri pada Pembenihan Ikan Kerapu Tikus (Cromiteptes altivelis).* Ditjen Perikanan. Deptan