

**KLONASI PARSIAL GEN AMP (*ANTI MICROBIAL PEPTIDE*) DAN GEN MX
DARI IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)**

Wardiyanto*

Dosen Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Jl.Prof.S.Brodjonegoro No.1 Gedong Meneng Bandar Lampung 35145

*Penulis untuk korespondensi wardibdifp@gmail.com

ABSTRAK

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan virus masih menjadi permasalahan pada marikultur kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) di Indonesia. Peningkatan sistem imun kerapu tikus secara alami yang berkaitan dengan imunitas bawaan dan pencegahan replikasi virus dengan perantaraan gen-gen terkait menjadi pendekatan baru untuk mengurangi infeksi patogen yang dapat dilakukan dengan klonasi gen. Penelitian dilakukan untuk mempelajari kehadiran gen AMP dan Mx dari kerapu tikus dan kesamaan secara bioinformatik gen tersebut dibandingkan dengan sekuen nukleotida dari jenis kerapu lainnya yang lebih dulu ditemukan. Metode penelitian klonasi gen AMP dan Mx dilakukan secara parsial dengan menggunakan teknik PCR dilanjutkan dengan pembacaan basa nukleotida (*nucleotide sequencing*) dan pengurutan/pensejajaran basa nukleotida secara bersamaan (*nucleotide alignment*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen AMP dan gen Mx dari kerapu tikus memiliki kesamaan 85,3% dan 86,9 % dengan urutan basa nukleotida kerapu (*Epinephelus coioides*, *E.lanceolatus*). Prediksi bentuk tiga dimensi susunan asam amino secara sintesis dari kedua gen tersebut juga menunjukkan kemiripan bentuk yang menunjukkan kemungkinan kesamaan mekanisme fungsi kedua gen untuk menghambat infeksi penyakit.

Kata kunci: bioinformatika, kerapu tikus, gen AMP, gen Mx, klonasi

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan salah satu komoditas marikultur penting untuk negara-negara Asia Tenggara dan Asia-Pasifik (Harikrishnan *et al.*, 2010). Indonesia menjadi salah satu negara dengan keragaman spesies kerapu budidaya yang besar termasuk didalamnya ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*), ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*), ikan kerapu lumpur (*E.coioides*), ikan kerapu malabar (*E.malabaricus*) dan beragam jenis kerapu hibrid yang saat ini budidayanya terus dikembangkan. Ikan kerapu tikus merupakan ikan kerapu berharga tinggi dibandingkan jenis kerapu lainnya dengan fungsi sebagai ikan konsumsi dalam keadaan hidup dengan ukuran dewasa dan sebagai ikan hias pada ukuran juvenil.

Ikan kerapu tikus mengalami produksi yang fluktuatif karena infeksi patogen yang bervariasi antara bakteri dan virus (Harikrishnan *et al.*, 2011), selama budidaya terutama pembesaran yang mengandalkan tempat terbuka dibandingkan dengan budidaya dalam wadah budidaya. Mortalitas tinggi dapat terjadi karena infeksi patogen dalam waktu singkat dan hal ini sangat merugikan secara ekonomi (Harikrishnan *et al.*, 2010;2011). Banyak pendekatan yang digunakan mengendalikan infeksi patogen dalam marikultur yang terbagi menjadi dua tujuan yaitu langsung mengarah ke patogen terutama dengan penggunaan antibiotik dan bahan kimia dan pendekatan baru dengan membangkitkan sistem imun ikan bawaan (*innate immunity-specific immunity*) dan imunitas daptan (*acquired immunity-non specific immunity*) yang teknisnya menggunakan tanaman herbal, imunostimulan yang fungsinya membangkitkan gen-gen yang berhubungan dengan imunitas.

Sistem imunitas termasuk fisiologi dan psikologi pada hewan akuatik sangat dipengaruhi oleh lingkungan meskipun dipelihara dalam wadah yang spesifik karena perubahan lingkungan lokal yang dipengaruhi oleh air yang variatif sepanjang hari bahkan musim (Bowden *et al.*, 2007). Variasi perubahan lingkungan ini, akan menempatkan hewan akuatik pada kerentanan terinfeksi penyakit pada jangka panjang, meskipun berbagai teknik budidaya telah dikembangkan untuk menciptakan keseimbangan antara organisme patogen yang berbahaya dan tidak membahayakan ikan budidaya. Imunitas bawaan merupakan mekanisme awal dari ikan untuk melawan penyakit baik non-infeksi dan infeksi (Magnadottir, 2006). Tetapi imunitas bawaan juga berperan membangkitkan sistem imun daptan sehingga membantu melawan patogen lain yang masuk dalam tubuh termasuk interferon yang dikenal berperan sebagai anti virus (Robertsen, 2006).

Salah satu gen yang berperan pada imunitas bawaan dasar adalah gen AMP yang menurut Hazloff (2002) dan Brown dan Hancock (2006) merupakan peptida pendek yang ditemukan sejak awal menjadi senjata pertahanan yang efektif pada hewan dan tanaman untuk melawan organisme seluler bahkan non seluler seperti bakteri, fungi dan virus. Protein AMP selain ditemukan pada hewan teresterial dan akuatik seperti amphihi dan ikan (Chinchar *et al.*, 2004; Shi dan Camus, 2006), katak gunung berkaki kuning (*Rana mucosa*) (Rollins-Smith *et al.* 2006); sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Salerno *et al.*, 2007); udang windu (*Penaeus monodon*) (Amparyup *et al.*, 2008); ikan kerapu lumpur (Yin *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2007). Gen AMP sangat bervariasi (Wang dan Wang, 2004), tetapi belum terdapat informasi yang akurat pada ikan-ikan laut tentang konformasi proteinnya sehingga dapat diterapkan pada budidaya perikanan.

Gen Mx yang membentuk protein Mx adalah komponen kunci dari aktivitas anti virus yang terekspresi setelah induksi oleh interferon pada semua makhluk hidup (Leong *et al.*, 1998; Haller *et al.*, 2007). Variasi protein Mx sangat tinggi diantara makhluk hidup, sehingga keberadaannya perlu diteliti lebih mendalam yang terkait fungsi dan strukturnya. Pada manusia, protein Mx tidak secara langsung berfungsi sebagai anti viral tetapi mendukung sistem imun bawaan untuk mendeteksi keberadaan virus (Haller *et al.*, 2007). Pada hewan akuatik, keberadaan protein Mx terdeteksi memiliki kemampuan anti viral dengan mekanisme yang berbeda-beda. Spesies ikan yang memiliki protein Mx misalnya ikan kerapu lumpur (Lin *et al.* 2006; Chen *et al.*, 2006); salmon (Larsen *et al.*, 2004); Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Lin *et al.*, 2005; Ooi *et al.*, 2006); flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari keberadaan gen AMP dan gen Mx dari ikan kerapu tikus dengan klonasi parsial dan sekuen nukleotidanya digunakan untuk studi bioinformatika diantaranya pensejajaran (*alignment*), kekerabatannya dengan pohon filogeni dan prediksi struktur tiga dimensi proteinnya.

Penelitian ini dapat memberikan manfaat berupa informasi kemiripan gen AMP dan gen Mx dari ikan kerapu tikus dengan jenis ikan kerapu lainnya, tingkat kekerabatannya diantara gen-gen yang telah dipublikasi lebih awal dan struktur dan pola proteinnya sehingga dapat mendukung informasi tentang fungsi dan manfaat gen AMP dan gen Mx dari ikan kerapu tikus untuk studi lain yang lebih mendalam.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan metode kerja klonasi parsial gen AMP dan gen Mx diurutkan dalam Tabel 1. Isolasi RNA gen AMP dan gen Mx dilakukan dari jaringan insang, ginjal depan dan limfa ikan kerapu tikus yang berasal dari Situbondo, Jawa Timur. Total RNA atau mRNA yang diubah menjadi cDNA dengan menggunakan enzim reverse transkriptase selama 60 menit pada suhu 37 °C dengan komposisi bahan PCR adalah RT enzim 1 µl; RT buffer 2 µl; DTT 2 µl; oligo DT 1 µl; dNTPs 1 µl; mRNA 3 µl dan ddH₂O sampai volume mencapai 20 µl. DNA komplementer (cDNA) berkualitas kemudian dijadikan *template* untuk diperbanyak dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk gen AMP dan gen Mx dengan komposisi akhir 25 µl dengan rincian Taq polymerase 0,25 µl ; 10X buffer PCR 2,5 µl, dNTPs 0,5 µl; Primer Forward dan Reverse masing-masing 0,5 µl; cDNA 1 µl dan ddH₂O 19,75 µl. Program PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi gen AMP dan gen Mx adalah 94 °C 5'; 94 °C 30"; 55 °C (AMP); 50 °C (Mx); 72 °C 7; dan 15 °C sebanyak 30 siklus.

Produk PCR gen AMP dan gen Mx divisualisasikan dengan agarose gen elektroforesis 1%. Produk PCR dari gel kemudian dipotong dan diisolasi kembali untuk dimurnikan dan diambil untuk kepentingan klonasi gen. Klonasi gen menggunakan vektor komersil pGEM-T dan inang bakteri *Eschericia coli* JM107. Vektor ini memiliki beberapa kemudahan terutama untuk mengetahui arah sekuen yang benar dengan skrining putih-biru untuk mengetahui hasil klonasi gen. Isolasi plasmid dilakukan dengan preparasi mini dan pengurutan basa nukleotida (*nucleotide sequencing*) dilakukan oleh perusahaan komersil yang menyediakan jasa tersebut.

Pensejajaran (*alignment*) basa nukleotida dilakukan secara online dalam GenBank untuk menghasilkan data kemiripan dan kekerabatan dengan sekuen nukleotida yang telah terpublikasi lebih dahulu dengan bantuan program BioEdit untuk menghilangkan basa nukleotida yang meragukan dari hasil pengurutan basa nukleotida. Prediksi tiga dimensi protein dilakukan dengan menggunakan program Raswin yang membutuhkan data sekuen nukleotida masing-masing gen untuk dibandingkan gambar struktur dan ukurannya.

Hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan susunan basa nukleotida, susunan asam amino dan prediksi bentuk tiga dimensi protein ikan kerapu tikus dengan ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) dan ikan kerapu lumpur (*E.coioides*).

HASIL

Gen AMP dan gen Mx merupakan gen-gen yang secara alamiah berperan pada sistem imunitas bawaan sehingga menjadi alternatif untuk meningkatkan sistem imun yang disebabkan oleh infeksi penyakit patogen bakterial dan virus. Klonasi gen AMP dan gen Mx dapat dilakukan dari jaringan sirip kerapu tikus dengan prosedur klonasi parsial. Ukuran band untuk produk PCR dari gen AMP sebesar 200 bp dan gen Mx sebesar 600 bp (data tidak ditunjukkan). Hasil sekuen nukleotida dari gen AMP dan gen Mx dapat dilakukan dengan menggunakan sekuen promotor T7 yang terdapat dalam vektor pGEM-T.

Hasil analisis susunan asam amino terhadap gen AMP menunjukkan terdapat kemiripan sebesar 85,3% (Gambar 1). Hasil analisis susunan nukleotida pada gen Mx juga menunjukkan kemiripan sebesar 86,9% (Gambar 2). Kemiripan basa nukleotida yang rendah antara gen Mx dari tiga spesies kerapu yang berbeda karena tingginya perbedaan *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang merupakan penentu dari diversitas genetik tetapi memiliki fungsi yang sama (Gambar 2). Pohon filogeni gen AMP menunjukkan bahwa kedekatan gen AMP dari ikan kerapu tikus ditunjukkan dengan gen AMP-epinacidin yang berasal dari ikan kerapu lumpur (Gambar 3). Sedangkan dari pohon filogeni gen Mx dari ikan kerapu tikus memiliki kedekatan dengan gen putatif reverse transkriptase dibandingkan dengan gen Mx dari ikan kerapu lainnya (Gambar 4).

Prediksi bentuk protein dari gen AMP dan gen Mx ikan kerapu tikus menunjukkan beberapa perbedaan dengan spesies kerapu lainnya. Prediksi tiga dimensi protein gen AMP menunjukkan perbedaan ukuran dan letak α -heliks dan β -sheets (Gambar 5). Lebih lanjut, prediksi bentuk tiga dimensi dari gen Mx dengan ikan kerapu lumpur memiliki perbedaan struktur sekunder (Gambar 6).

PEMBAHASAN

Klonasi parsial atau klonasi sebagian gen dari gen utuh merupakan salah satu langkah memprediksi struktur dan fungsi gen secara alamiah. Prediksi ini dibutuhkan misalnya untuk merancang studi dari fungsi gen-gen tersebut yang berhubungan dengan fisiologi atau pertumbuhan saat ikan dibudidayakan. Karena keterkaitan fungsi antar gen sangat erat maka studi fungsi dan struktur tunggal gen diperlukan sebelum melakukan studi yang lebih mendalam dan saling berhubungan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat kemiripan yang rendah (85,3%) dari gen AMP ikan kerapu tikus jika dibandingkan dengan ikan kerapu kertang dan ikan kerapu lumpur. Perbedaan tersebut karena perbedaan asam amino yang terbentuk dari urutan basa nukleotida antara gen-gen AMP yang berasal dari ikan kerapu kertang dan ikan kerapu lumpur yang berasal dari perbedaan genus secara klasifikasi ikan. Yeaman dan Yount (2003) menyebutkan bahwa keragaman gen AMP dari mahluk hidup merupakan bentuk evolusi dari pertahanan imun bawaan yang diperantara molekul sehingga variasinya akan mudah ditemukan pada setiap mahluk hidup. Menurut, Moal dan Servin (2006) bahkan AMP dapat ditemukan pada jaringan pernafasan dan terutama pencernaan karena patogen mengalami kontak dengan inang melalui kedua sistem kehidupan tersebut.

Perbedaan tersebut lebih lanjut teramati pada perbedaan dari prediksi struktur tiga dimensi protein AMP yang terbentuk terutama dari ukuran dan letak α -heliks dan β -sheets. Ukuran protein AMP yang sangat sederhana dan kecil (12-100 asam amino) merupakan ciri khas protein AMP yang teramati pada mahluk hidup, tetapi fleksibelitasnya mampu menangkal berbagai jenis patogen dan apatogen lintas spesies (Jenssen *et al.*, 2006). Tetapi perbedaan tersebut kemungkinan tidak mengubah fungsi dari AMP sehingga secara filogeni berkerabat dengan epinidicin yang merupakan nama gen AMP dari ikan kerapu lumpur. Keekerabatan gen AMP dapat juga diidentifikasi dengan fungsi anti mikrobiahnya. Chekmenev *et al.* (2006) bahkan menemukan 3 bentuk dari piscidins, yaitu AMP dari ikan tetapi hanya piscidins 1 yang paling menunjukkan potensi anti mikrobiah paling kuat dibandingkan piscidins 3 meskipun secara keekerabatan sangat dekat. Fungsi dan manfaat protein AMP menunjukkan aktivitas yang lebih luas tidak hanya mendukung imunitas bawaan tetapi juga aktivitas anti tumor, aktivitas mitogenik, mengatur jalur sinyal transduksi bahkan respon imunitas dapatan (Kamysz *et al.*, 2003). Tipe dan mekanisme dinamis dari AMP menunjukkan mekanisme aksinya dalam inang (Chekmenev *et al.* 2006).

Klonasi dan pengurutan basa nukleotida gen Mx dari ikan kerapu bebek juga menunjukkan kemiripan basa nukleotida yang rendah (86,9%) antara gen Mx ikan kerapu tikus dengan dua spesies lainnya yaitu ikan kerapu kertang dan ikan kerapu lumpur. Perbedaan tersebut ditunjukkan dengan perbedaan *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang merupakan penentu dari diversitas genetik. Kemiripan sekuen nukleotida membawa perbedaan pada susunan asam amino yang teramati pada prediksi bentuk tiga dimensi protein Mx yang terbentuk. Sangat kontras, bentuk protein Mx yang terbentuk antara ikan kerapu

tikus dan ikan kerapu lumpur dimana secara struktural sekunder sangat berbeda dimana banyak struktur *-sheets* yang tidak dimiliki oleh ikan kerapu tikus tetapi dimiliki oleh ikan kerapu lumpur yang kemungkinan belum lengkapnya keseluruhan sekuen nukleotida gen Mx ikan kerapu tikus. Ooi *et al.* (2006), menyatakan bahwa protein Mx sangat mirip (*highly conserve*) diantara vertebrata karena fungsinya yang secara umum menunjukkan aktivitas antivirus lintas jenis.

Kemungkinan lainnya, gen Mx pada ikan kerapu tikus akan memiliki fungsi yang relatif sama dari ikan kerapu lumpur jika diaplikasikan yang berhubungan dengan pencegahan replikasi virus dalam tubuh inang. Dari keberagaman protein Mx tersebut dapat diketahui aktivitasnya untuk mengeliminasi virus dari berbagai jenis. Lin *et al.* (2005) memberi contoh bahwa Mx protein dari Japanese flounder memberikan aktivitas anti viral setelah 72 jam tetapi transkripsi dan ekspresi proteinnya mulai aktif setelah 48 jam.

Hasil kekerabatan secara filogeni juga mendukung perbedaan fungsi gen Mx dari ikan kerapu tikus yang ditunjukkan dengan kekerabatan yang bukan dengan gen Mx dari ikan kerapu atau ikan lain, tetapi dari gen putatif reverse transkriptase yang merupakan bagian dari *GTPases superfamily* dengan berat molekul besar (Haller and Kochs, 2002). Protein Mx yang ditemukan dari ikan kerapu lumpur oleh Lin *et al.* (2006) menunjukkan tiga bentuk yaitu MxI, MxII dan MxIII yang ketiganya dapat dibedakan dengan kemiripan (*conserve*) dengan domain Mx putative GTP-binding, dyaminin family signature dan leucine zipper motif yang membuktikan bahwa protein ini bervariasi meskipun fungsinya sama yaitu diinduksi oleh interferon dan merespon langsung terhadap transkripsi virus.

Poisa-Beiro *et al.* (2007) menegaskan bahwa otak menjadi pusat kontrol ekspresi protein Mx dibandingkan organ dan jaringan lainnya seperti ginjal depan dan darah yang asumsikan membawa banyak gen-gen yang berperan pada imunitas dan respon terhadap infeksi. Pada aplikasi dalam budidaya, penggunaan pakan formulasi dengan minyak tumbuhan dapat menurunkan ekspresi protein Mx dibandingkan penggunaan minyak ikan dalam pakan (Montero *et al.*, 2008) dan vaksin DNA yang mengkode virus dapat meningkatkan ekspresi protein Mx (Kim *et al.*, 2000). Protein Mx pada kerapu tikus dapat membantu eliminasi infeksi virus yang selama ini menjadi hambatan budidaya seperti Nodavirus, Iridovirus dan Viral Nervous Necrosis dengan menerapkannya sebagai vaksin atau

imunostimulan melalui pakan atau cara lain untuk mewujudkan budidaya yang ramah lingkungan.

KESIMPULAN

Gen AMP dan gen Mx dapat diklonasi dan memiliki kemiripan yang rendah dengan sekuen nukleotida dan sekuen asam amino dari 2 spesies kerapu lain. Kesamaan struktur dan fungsi gen AMP dan gen Mx dapat diprediksi dengan struktur tiga dimensi dari susunan proteinnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amparyup P, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Tassanakajon A. 2008. Molecular Cloning, Genomic Organization and Recombinant Expression of a Crustin-Like Antimicrobial Peptide from Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology* 45:1085-1093.
- Bowden TJ, Thompson KD, Morgan AL, Gratacap RML, Nikosklainen S. 2007. Seasonal Variation and the Immune Response: A Fish Perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 22:695-706.
- Brown KL, Hancock REW. 2006. Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptide. *Current Opinion in Immunology* 18:24-30.
- cDNA Sequence and Tissue Expression of an Antimicrobial Peptide, Dicentracin; a New Component of the Moronecidin Family isolated from Head Kidney Leukocytes of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B* 146:521-529.
- Chekmenev EY, Vollmar BS, Forseth KT, Manion MN, Jones SM, wagner TJ, Endicott RM, Kyriass BP, Homem LM, Pate M, He J, Raines J, Gor'kov PL, Brey WW, Mitchell DJ, Auman AJ, Ellard-Ivey MJ, Blazyk J, Cotten M. 2006. Investigating Molecular Recognition and Biological Function at Interfaces using Piscidins, Antimicrobial Peptide from Fish. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758:1359-1372.
- Chen YM, Su YL, Lin JHY, Yang HL, Chen TH. 2006. Cloning of an Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and Characterisation of Its Expression in Response to Nodavirus. *Fish & Shellfish* 20:58-71.
- Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, Rollins-Smith L. 2004. Inactivation of Viruses Infecting Ectothermic Animals by Amphibian and Piscine Antimicrobial Peptide. *Virology* 323:268-275.
- Fernandez-Trujillo A, ferro P, Garcia-Rosado E, Infante C, Alonso MC, bejar J, Borrego JJ, Machado M. 2008. Poly I:C Induces Mx Transcription and Promotes an Antiviral State against Sole Aquabirnavirus in the Flatfish Senegalese Sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish & Shellfish Immunology* 24:279-285.

- Haller O, Kochs G. 2002. Interferon-Induced Mx Proteins: Dynamin-Like GTPases with Antiviral Activity. *Traffic* 3:710-717.
- Haller O, Staeheli P, Kochs G. 2007. Interferon-Induced Mx Proteins in Antiviral Host Defense. *Biochimie* 89:812-819.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2010. Molecular Studies, Disease Status and Prophylactic Measure in Grouper Aquaculture: Economic Importance, Disease and Immunology. *Aquaculture* 309:1-14.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2011. Fish Health Aspects in Grouper Aquaculture. *Aquaculture* 320:1-21.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. 2006. Peptides Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 19(3):491-511.
- Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J. 2003. Novel Properties of Antimicrobial Peptides. *Acta Biochimica Polonica* 50 (2):461-469.
- Kim CH, Johnson MC, Drennan JD, Simon BE, Thomann E, Leong JAC. 2000. DNA Vaccine Encoding Viral Glycoproteins Induce Nonspecific Immunity and Mx Protein Synthesis in Fish. *Journal of Virology* 74(15):7048-7054.
- Larsen R, Rokenes TP, Robertsen. 2004. Inhibition of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication by Atlantic Salmon Mx1 Protein. *Journal of Virology* 78 (15): 7938-7944.
- Leong JAC, Trobridge GD, Kim CHY, Johnston M, Simon B. 1998. Interferon-Inducible Mx Proteins in Fish. *Immunological Reviews* 166:349-363.
- Lin CH, John JAC, Lin CH, Chang CY. 2006. Inhibition of Necrosis Virus Propagation by Fish Mx Proteins. *Biochemical and Biophysical Research* 351:534-539.
- Lin OE, Ohira T, Hirono I, Saito-Taki T, Aoki T. 2005. Immunoanalysis of Antiviral Mx Protein Expression on Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Cells. *Developmental and Comparative Immunology* 29:443-455.
- Magnadottir B. 2006. Innate Immunity of Fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20:137-151.
- Moal VL, Servin AL. 2006. The Front Line of Enteric Host Defense Against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* 19(2):315-337.
- Montero D, Grasso V, Izquierado MS, Ganga R, Real F, Tort L, Cabalero MJ, Acosta F. 2008. Total Substitution of Fish Oil by Vegetable Oil in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Diets: Effects on Hepatic Mx Expression and Some Immune Parameters. *Fish & Shellfish Immunology* 24:147-155.
- Ooi EL, Hirono I, Aoki T. 2006. Functional Characterisation of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx Promoter. *Fish & Shellfish Immunology* 21:293-304.
- Pan CY, Chen JY, Cheng YHE, Chen CY, Ni IH, Sheen JF, Pan YL, Kuo CM. 2007. Gene Expression and Localization of Epinidicin-1 Antimicrobial peptide in the Grouper

- (*Epinephelus coioides*) and Its Role in Protecting Fish Against Pathogenic Infection. DNA and Cell Biology 26 (6):403-413.
- Poisa-Beiro L, Dios S, Montes A, Aranguren R, Figueras A, Novoa B. 2008. Nodavirus Increase the Expression of Mx and Inflammatory Cytokines in Fish Brain. Molecular Immunology 45 (1):218-225.
- Robertsen B.2006.The Interferon System of Teleost Fish. Fish & Shellfish 20:172-191.
- Rollins-Smith LA,Woodhams DC,Reinart LK,Vredenburg VT, Briggs CJ, Nielsen PF, Conlon JM. 2006. Antimicrobial Peptide Defense of Mountain Yellow-Legged Frog (*Rana mucosa*).Developmental and Comparative Immunology 30:831-842.
- Shi J, Camus AC. 2006. Hecidins in Amphibians and Fishes:Antimicrobial Peptide Iron-Regulatory Hormones?. Developmental and Comparative Immunology 30:746-755.
- Wang Z, Wang G. 2004. APD:the Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Research 32:590-592.
- Yeaman MR,Yount N.2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance.Pharmacol Rev 55:27-55.
- Yin ZX, He W, Chen WJ, Yan JH, Yang JN, Chan SM, He JG. 2006. Cloning, Expression and Antimicrobial Activity of an Antimicrobial Peptide, Epinecidin-1, from the Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*. Aquaculture 253:204-211.
- Zaslloff M. 2002. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms.Nature 415:389-395.

Tabel

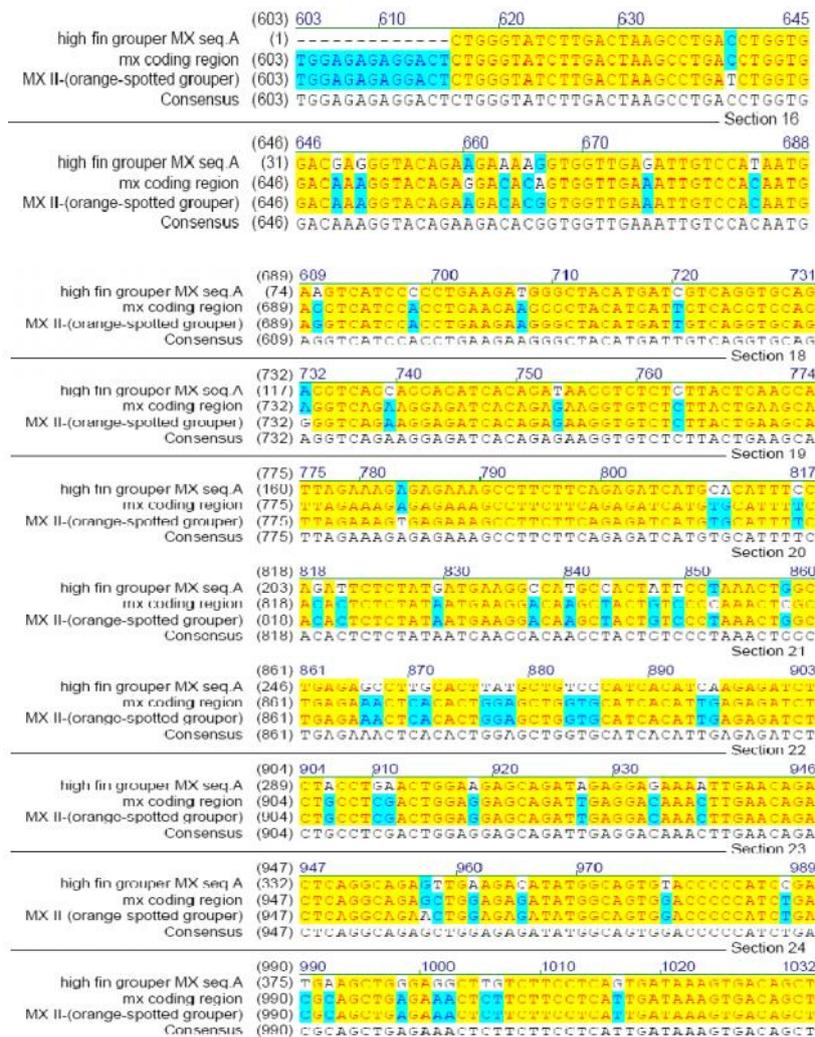
Tabel 1. Bahan, Metode, Komponen dan Fungsi Penelitian

No	Bahan atau Metode	Komponen atau Fungsi
1	PCR Primer AMP	AMP F5' ggcagcatctgtagat3' AMP R5' ggaatctgtgttacg3'
2	PCR Primer AMP	MX F5' cgtagtttcttcac3' MX R5' agtgatcat gtcg3'
3	TRIzol reagent (Invitrogen, USA)	Isolasi RNA dari jaringan sampel
4	pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)	Plasmid vektor klonasi Terdapat T7 dan SP6 promoter sequences
5	<i>Eschericia coli</i> JM109	Bakteri vektor klonasi, sel kompeten
6	Qiagen mRNA purification kit (Qiagen USA)	Purifikasi total RNA dari gel agarose
7	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)	Estraksi total RNA dari agarose
8	1X TE	0,01 M Tris-HCl, pH 8,0 0,001 M EDTA
9	1X TAE	0,04 M Tris-acetate 0,002 M EDTA
10	Choloroform:IAA	24:1 campuran cholofoam dan isoamyl alkohol
11	Phenol/Chlorofoam	1:1 campuran trace element dari phenol dan chlorofoam:IAA
12	Larutan I	50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA
13	Larutan II	0,2 N NaOH 1 % SDS
14	Larutan III	5 M Potasium asetat, 3 M asam asetat glasial
15	Larutan stok Ampisilin	50 mg/ml dalam H ₂ O
16	10 X bufer reaksi PCR	100 mM Tris-HCl pH 8,3 500 mM KCl 0,1(w/v) gelatin MgCl ₂ 15 mM
17	Laturan stok IPTG (0,1 M)	1,2 g IPTG, tambahkan air 50 ml, filter steril
18	X-Gal (2 ml)	100 mg 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- -D-galactosidase larutkan dalam 2 ml N'-dimethyl-formamide
19	Medium Luria-Bertani (LB) per liter	10 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl, pH 7,0 dengan NaOH.
20	Medium LB dengan Ampisilin	100 µl dari 100 mM IPTG dan 20 µl dari 50 mg/ml X-Gal
21	Medium SOC (100 ml)	2,0 g Bacto-tryptone; 0,5 g Bacto-yeast extract, 1 ml 1M NaCl; 0,25 ml 1 M KCl; 1 ml stok 2 M Mg ²⁺ , filter steril . 1 ml 2 M glukosa.
22	2X buffer rapid ligasi	60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 20 mM MgCl ₂ , 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polyethylene glycol

Gambar

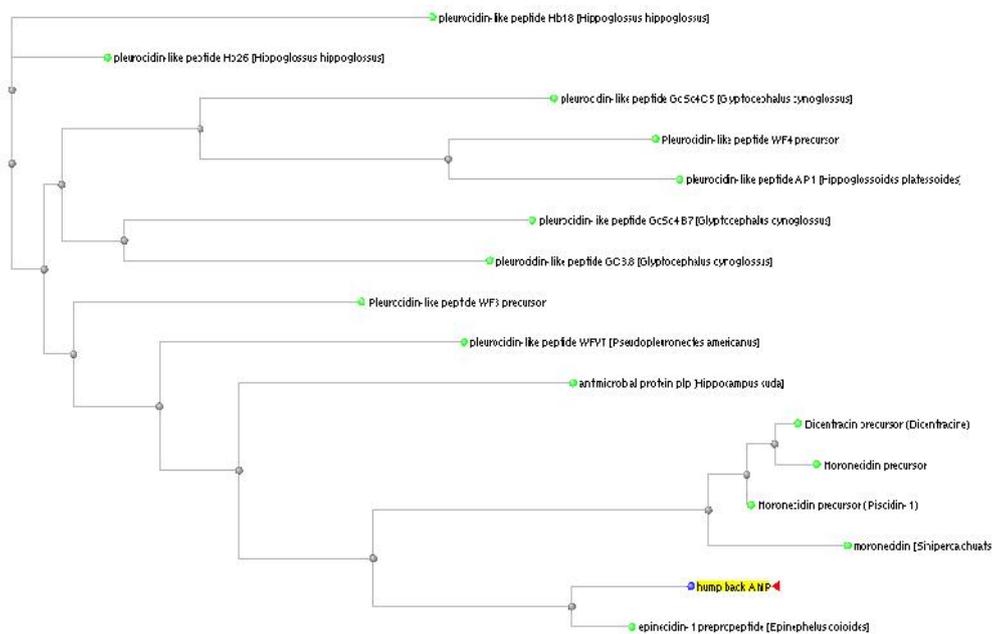


Gambar 1. Hasil pensejajaran (*alignment*) sekuen asam amino gen AMP (*anti microbial peptide*) antara ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)-**high fin grouper AMP seq.B** dengan sekuen-sekuen asam amino gen AMP dari ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*)-**giant grouper** dan ikan kerapu lumpur (*E.coioides*)-**orange-spotted grouper**. Kemiripan antara ketiga sekuen asam amino gen AMP tersebut adalah 85,3%.Rendahnya kemiripan karena perbedaan asam amino yang terbentuk dari urutan basa nukleotida antara gen-gen AMP.

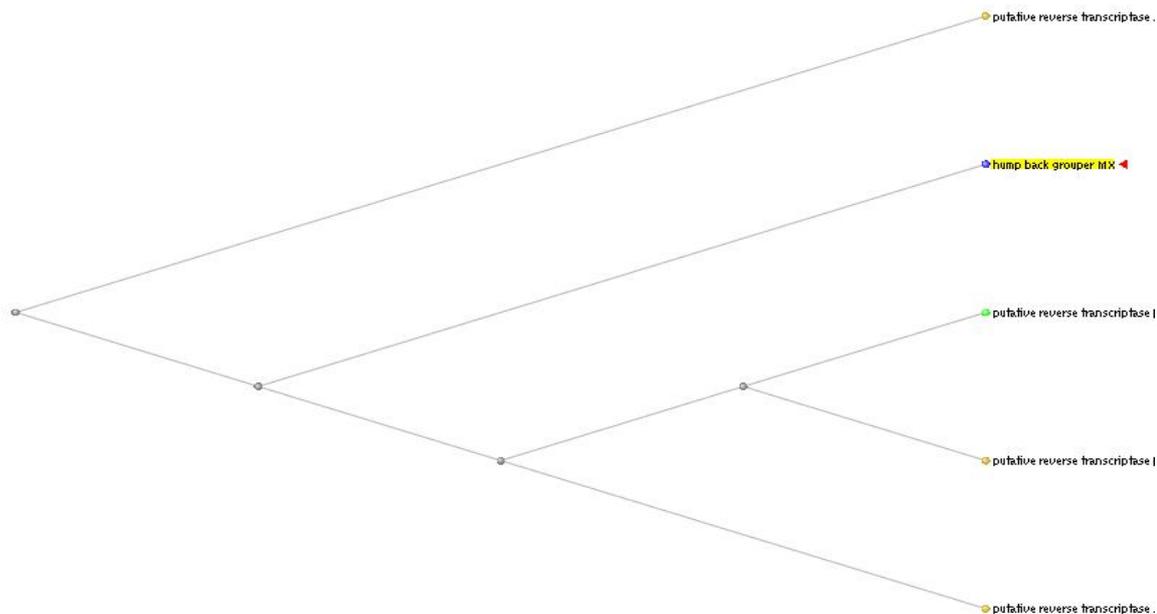


	(1033)	1033	1040	1050	1060	1075
high fin grouper MX seq.A (418)	TTCACCTCAGGATGCCATCAGTCTGACTACAGGAGAGGAACTCA					
mx coding region (1033)	TTCACCTCAGGATGCCATCAGTCTGACTACAGGAGAGGAACTCA					
MX II-(orange-spotted grouper) (1033)	TTCACCTCAGGATGCCATCAGTCTGACTACAGGAGAGGAACTCA					
Consensus (1033)	TTCACCTCAGGATGCCATCAGTCTGACTACAGGAGAGGAACTCA					
	Section 26					
	(1076)	1076	1090	1100	1118	
high fin grouper MX seq.A (461)	ASTGTGGAGACBAGCTCAATGTCTTTCTGCACCTCAGAAGAGA					
mx coding region (1076)	ASTGTGGAGACBAGCTCAATGTCTTTCTGCACCTCAGAAGAGA					
MX II-(orange-spotted grouper) (1076)	ASTGTGGAGACBAGCTCAATGTCTTTCTGCACCTCAGAAGAGA					
Consensus (1076)	ASTGTGGAGACBAGCTCAATGTCTTTCTGCACCTCAGAAGAGA					
	Section 27					
	(1119)	1119	1130	1140	1150	1161
high fin grouper MX seq.A (504)	GTTTGAAAAGTGGAAATGCCCACTGGACCAAGCAGGAGAAAAG					
mx coding region (1119)	GTTTGAAAAGTGGAAATGCCCACTGGACCAAGCAGGAGAAAAG					
MX II (orange spotted grouper) (1119)	GTTTGAAAAGTGGAAATGCCCACTGGACCAAGCAGGAGAAAAG					
Consensus (1119)	GTTTGAAAAGTGGAAATGCCCACTGGACCAAGCAGGAGAAAAG					
	Section 28					
	(1162)	1162	1170	1180	1190	1204
high fin grouper MX seq.A (547)	TTTAAACAAGAGSATTGAGAAAAGGTTGGAGAACTA-----					
mx coding region (1162)	TTTAAACAAGAGSATTGAGAAAAGGTTGGAGAACTATGAGGAG					
MX II-(orange-spotted grouper) (1162)	TTTAAACAAGAGSATTGAGAAAAGGTTGGAGAACTATGAGGAG					
Consensus (1162)	TTTAAACAAGAGSATTGAGAAAAGGTTGGAGAACTATGAGGAG					

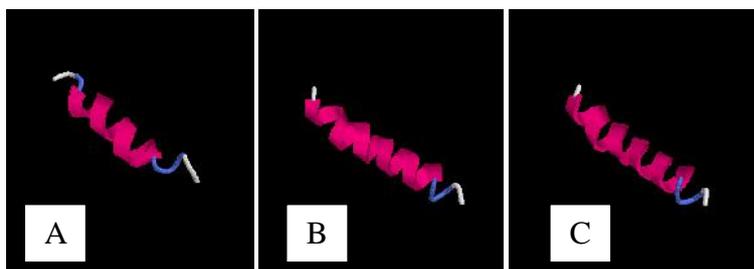
Gambar 2. Hasil pensejajaran (*alignment*) sekuen nukleotida gen Mx antara ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)-**high fin grouper Mx seq.A**, dengan sekuen-sekuen nukleotida gen Mx dari ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*)-**mx coding region** dan ikan kerapu lumpur (*E.coioides*)-**MX II-orange-spotted grouper**. Kemiripan antara ketiga sekuen nukleotida gen Mx tersebut adalah 86,9% karena tingginya perbedaan *single nucleotide polymorphism* (SNP)-nukleotida berwarna hijau muda.



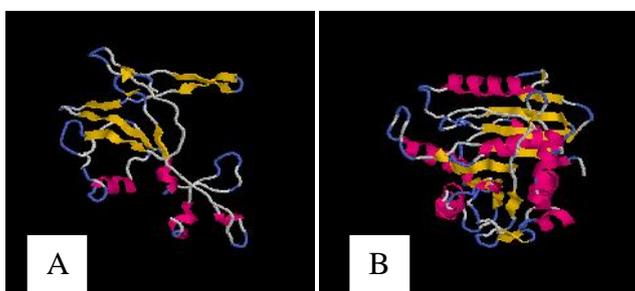
Gambar 3. Pohon filogeni gen AMP dari ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)-**hump back AMP** diantara gen-gen AMP lainnya.Gen AMP ikan kerapu tikus memiliki kekerabatan dengan epinecidin yang merupakan nama lain gen AMP dari ikan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*).



Gambar 4. Pohon filogeni gen Mx dari ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*)-**hump back MX** diantara gen-gen Mx lainnya.



Gambar 5. Prediksi tiga dimensi protein gen AMP dari ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) (A), ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*) (B) dan ikan kerapu lumpur (*E. coioides*) (C). Terdapat perbedaan ukuran struktur dan letak α -heliks dan β -sheets dari ketiga bentuk protein tersebut.



Gambar 6. Prediksi tiga dimensi protein gen Mx dari ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) (A) dan ikan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*) (B). Terdapat perbedaan bentuk struktur sekunder (*secondary structure*) dari protein antara kedua protein gen Mx tersebut.