

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

## GEN PENYANDI VIRAL PROTEIN 15 (VP-15) *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV) DAN APLIKASINYA SEBAGAI VAKSIN REKOMBINAN PADA UDANG WINDU

Andi Parenrengi<sup>#</sup>, Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum, Andi Tenriulo, dan Agus Nawang

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan

(Naskah diterima: 7 November 2017; Revisi final: 4 Desember 2017; Disetujui publikasi: 4 Desember 2017)

### ABSTRAK

Infeksi *white spot syndrome virus* (WSSV) dapat menyebabkan kematian massal pada budidaya udang windu *Penaeus monodon* di Indonesia. Infeksi yang terjadi secara sistematis tersebut disebabkan oleh peran gen nucleocapsid viral protein (VP-15). Upaya pengembangan gen VP-15 WSSV untuk menginduksi respons imun dan menetralkan terhadap infeksi WSSV pada udang windu perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan merekombinasikan gen penyandi VP-15 WSSV sebagai vaksin dsRNA, serta menganalisis aplikasinya pada udang windu. Gen VP-15 diisolasi dari udang windu yang terinfeksi WSSV, dikloning ke dalam suatu vektor dan ditransformasikan ke sel kompeten (bakteri *Escheria coli* DH5 $\alpha$ ). Plasmid diisolasi untuk mengonfirmasi *insert region* gen VP-15 melalui sekuensing nukleotida. Pembuatan vaksin rekombinan dilakukan secara *in-vitro* menggunakan kit MEGAscript RNAi dan diaplikasikan ke udang windu melalui metode injeksi dengan dosis tunggal 0,2  $\mu$ g dan kontrol (tanpa injeksi vaksin). Hewan uji yang digunakan berukuran panjang 14,75 $\pm$ 3,17 g dan bobot 11,64 $\pm$ 0,76 cm; serta dipelihara pada wadah bak fiber volume 250 L dengan kepadatan 10 ekor/bak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen penyandi VP-15 telah diisolasi dari udang windu dan vaksin rekombinan telah dihasilkan secara *in-vitro*. Analisis sekuens nukleotida memperlihatkan bahwa sisipan gen DNA VP-15 sebesar 253 bp dan menunjukkan kemiripan yang tinggi (99%) pada GenBank. Penggunaan vaksin rekombinan dsRNA dengan dosis 0,2  $\mu$ g memperlihatkan sintasan udang windu yang dapat mencapai 40,0% dibandingkan dengan kontrol hanya 3,3% (peningkatan 36,7%). Gambaran histopatologi pada jaringan hepatopankreas udang windu pada perlakuan kontrol menunjukkan adanya kerusakan inti sel, akibat infeksi WSSV. Gene VP-15 berpotensi sebagai bahan vaksin rekombinan dsRNA dalam mencegah infeksi WSSV.

**KATA KUNCI:** kloning; gen VP-15 WSSV; vaksin rekombinan; dsRNA; udang windu

**ABSTRACT:** *Gene encoding viral protein 15 (VP-15) of white spot syndrome virus and its application as a recombinant vaccine to tiger shrimp Penaeus monodon. By: Andi Parenrengi, Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum, Andi Tenriulo, and Agus Nawang*

*Infection of white spot syndrome virus (WSSV) causes bulk mortalities of tiger shrimp Penaeus monodon cultured in Indonesia. The nucleocapsid viral protein-15 (VP-15) is strongly suspected to be responsible for the systemic infection of WSSV. The development of VP-15 WSSV gene for inducing the immune response to and neutralize WSSV infection of tiger shrimp is vitally needed. The aim of this study was to isolate and clone the gene encoding VP-15 WSSV as dsRNA vaccine and assess the vaccine application to tiger shrimp. VP-15 gene was isolated from the genomic DNA of infected tiger shrimps, cloned into the vector, and transformed into competent cells (Escheria coli DH5a). The plasmid was isolated to confirm the insert region gene of VP-15 by the nucleotide sequence. Production of dsRNA vaccine was performed by in-vitro using MEGAscript RNAi kit and applied to tiger shrimp through muscular injection at a single dosage of 0.2  $\mu$ g and without dsRNA as a control treatment. The average size of tiger shrimps used was 14.75 $\pm$ 3.17 g in weight and 11.64 $\pm$ 0.76 cm in length and stocked in 250 L fiber tank at 10 ind./tank. The results of the study showed the VP-15 gene was successfully isolated from the tiger shrimps and the recombinant vaccine was produced by in-vitro. The analysis of nucleotide sequence showed that the inserted DNA was 253 bp and showed a high similarity*

<sup>#</sup> Korespondensi: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan. Jl. Makmur Dg. Sitakka No.129, Maros 90512, Sulawesi Selatan, Indonesia.  
Tel. + 62 411 371544  
E-mail: [andi\\_parenrengi@hotmail.com](mailto:andi_parenrengi@hotmail.com)

(99%) with VP-15 gene deposited in the GenBank. The application of dsRNA vaccine showed that the dosage of 0.2 ¼g resulted in the survival rate of 40.0% compared with without dsRNA (control) of 3.3% (36.7% increment). Hepatopancreas histology indicated obvious damages to cell nucleus in the un-vaccinated tiger shrimp caused by the virus infection. We suggest that the VP-15 gene is a very promising dsRNA recombinant vaccine against WSSV infection.

**KEYWORDS:** cloning; VP-15 WSSV; recombinant vaccine; dsRNA; tiger shrimp

## PENDAHULUAN

Udang windu *Penaeus monodon* dikenal sebagai komoditas utama budidaya tambak di Indonesia. Namun, sejak 1995 budidaya udang windu dihadapkan pada salah satu masalah penyakit yang disebabkan oleh *white spot syndrom virus* (WSSV). Infeksi WSSV ditandai dengan adanya bintik putih atau bercak putih pada *exoskeleton* dan epidermis terutama pada bagian karapas udang sehingga dikenal sebagai penyakit bintik putih. Hingga saat ini belum ada cara yang dinilai efektif dalam menanggulangi penyakit tersebut. Upaya peningkatan resistensi udang terhadap serangan patogen merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah penyakit pada akuakultur. Mekanisme yang potensial dalam peningkatan resistensi penyakit adalah produksi hewan akuatik melalui penerapan interferensi RNA (RNAi) atau juga dikenal sebagai teknologi dsRNA (*double stranded RNA*). RNAi merupakan suatu teknologi yang dapat menghambat ekspresi gen tertentu, termasuk ekspresi gen virulensi pada WSSV, sehingga virus tersebut tidak dapat menginfeksi udang. Pendekatan rekombinan DNA khususnya vaksin dsRNA telah mulai diaplikasikan pada budidaya udang. Induksi imun udang melalui vaksinasi telah dilaporkan dengan penggunaan rekombinan protein WSSV pada udang *P. chinensis* (Kim *et al.*, 2004), antiviral menggunakan untai ganda RNA pada udang *L. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

Berbagai penelitian dalam upaya untuk meningkatkan imunitas udang terhadap serangan patogen telah dilakukan, misalnya penggunaan vaksin polisakarida bersulfat yang diisolasi dari *Sargassum polycystum* (Chotigeat *et al.*, 2004), bakteri *Vibrio* sp. inaktif, serta WSSV yang dilemahkan dengan formalin (Namikoshi *et al.*, 2004). Witteveldt *et al.* (2004a) berhasil membuat vaksin rekombinan *viral protein-19* (VP19) yang mampu meningkatkan sintasan *P. monodon*. Meskipun demikian, aplikasi teknologi RNAi untuk penanggulangan penyakit pada udang masih terbatas. Sebagai langkah awal menuju pembuatan konstruksi gen untuk RNAi maka perlu dilakukan isolasi gen pengkode VP-15 dari udang windu yang terserang penyakit bintik putih. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan merekombinasikan gen penyandi VP-15 dari WSSV sebagai vaksin dsRNA, serta menganalisis aplikasinya pada udang windu.

## BAHAN DAN METODE

### Koleksi Sampel dan Ekstraksi Genomik DNA

Udang windu yang terserang WSSV dikoleksi dari tambak air payau di Takalar dengan ukuran bobot 7-15 g. Sebanyak 30 mg sampel daging dipreservasi dengan etanol 90% sebelum dilakukan ekstraksi genomik DNA. Ekstraksi genomik DNA dilakukan dengan metode CTAB yang telah dikembangkan pada udang windu (Parenrengi *et al.*, 2017).

### Deteksi Penyakit Bintik Putih

Deteksi penyakit bintik putih dilakukan melalui teknik PCR dengan mengikuti metode dari kit komersial IQ-2000 dan menggunakan genomik sebagai cetakan (*template*) DNA. Metode *nested* digunakan dalam deteksi infeksi penyakit WSSV. Pada PCR pertama dilakukan dengan tahapan: lima siklus untuk denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 62°C selama 30 detik; ekstensi pada 72°C selama 30 detik dan diikuti dengan 15 siklus denaturasi pada 94°C selama 15 detik; *annealing* pada 62°C selama 15 detik; dan ekstensi pada 72°C selama 20 detik. PCR kedua mengikuti tahapan: 25 siklus denaturasi pada 94°C selama 20 detik; *annealing* pada 62°C selama 30 detik; ekstensi pada 72°C selama 30 detik; dan diikuti dengan denaturasi pada 72°C selama 30 detik; dan akhirnya pada suhu 20°C selama 30 detik. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel agarosa (2,0% dalam 1x *TBE buffer*) untuk mengetahui tingkat infeksi dan didokumentasikan.

### Isolasi Gen VP-15 WSSV

Gen penyandi VP-15 diisolasi dari genomik DNA udang windu yang positif terinfeksi WSSV dengan tingkat akut. Isolasi gen mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Sarathi *et al.* (2010), dengan menggunakan primer forward VP-15 F: 5'-cgcgatccgatgacaaaatccccgagaac-3 dan primer reverse VP-15 R: 5- ccggaattcctaacgccttgacttgcggg-3' yang dilengkapi dengan situs restriksi masing-masing adalah *Bam-HI* dan *Eco-R1*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (GeneAmp PCR System 2700). Kit RTG (PureTaq Ready-To-GoPCR Beads) digunakan dalam reaksi PCR dengan penambahan primer (*forward* dan *reverse*) masing-masing sebanyak

1  $\mu\text{L}$  (50 pmol/mL) dan  $\text{dH}_2\text{O}$  untuk mencapai volume akhir 25 mL. Proses PCR dilakukan dengan tahapan pre-denaturasi 94°C selama tiga menit; dilanjutkan dengan denaturasi 94°C (satu menit), *annealing* 57°C (45 detik), dan ekstensi 72°C (satu menit). Siklus tersebut diulang sebanyak 35 kali. Tahapan berikutnya adalah ekstensi akhir 72°C selama lima menit. Hasil amplifikasi PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa (2,0% dalam 1x *TBE buffer*) untuk verifikasi keberhasilan isolasi dan didokumentasikan dengan kamera Geldoc.

### Pengklonan Gen Penyandi VP-15

Pengklonan gen penyandi VP-15 dilakukan di Laboratorium Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan di Depok. Fragmen DNA dari amplicon PCR yang telah dielektroforesis dalam agarosa gel dipotong, diisolasi kembali DNA-nya dan dimurnikan dengan kit *GF-1 Gel Recovery* berdasarkan prosedur yang disarankan. Selanjutnya fragmen DNA diklon dengan meligasikan ke vektor melalui metode yang ada pada *TOPO TA Cloning Kit* berdasarkan manual vendor dan ditransformasi ke bakteri kompeten *Escheria coli* DH5 $\alpha$ . Transformasi bakteri dilakukan melalui teknik kejut panas (*heat shock*) dengan mencampurkan 5  $\mu\text{L}$  hasil ligasi dengan 100  $\mu\text{L}$  sel kompeten bakteri dalam tabung mikro pada kondisi dingin. Hasil pencampuran tersebut diinkubasi pada suhu 42°C selama 30 detik sebagai perlakuan kejut panas dan dipindahkan ke dalam es selama 10 menit. Campuran gen VP-15 yang sudah ditransformasi ke dalam sel kompeten dipindahkan ke tabung polipropilena volume 15 mL dan ditambahkan media LB 1 mL. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan *rotary shaker* 120 rpm (satu jam) dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama lima menit.

*Skrining* koloni *E. coli* DH5 $\alpha$  yang mengandung plasmid rekombinan (TOPO-VP-15) dilakukan dengan metode seleksi koloni berwarna putih dan biru. Empat koloni putih yang diduga mengandung *insert* gen VP-15 digunakan sebagai *template*. Koloni putih ditumbuhkan pada media LB cair dalam test tube 15 mL, kemudian diinkubasi selama satu malam menggunakan *shaker* suhu 37°C dengan kecepatan 120 rpm. Panen bakteri dilakukan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama lima menit dan pelet yang terbentuk digunakan sebagai *template* untuk PCR.

Reaksi PCR menggunakan kit RTG, dengan menambahkan 1  $\mu\text{L}$  (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ) primer *forward* dan *reverse* dan  $\text{dH}_2\text{O}$  hingga mencapai volume 25  $\mu\text{L}$ . Metode deteksi insersi gen pada vektor kloning dilakukan dengan metode isolasi gen VP-15 WSSV seperti dijelaskan sebelumnya. Untuk keperluan

pengurutan DNA, maka plasmid bakteri rekombinan diisolasi dan selanjutnya disequensing di laboratorium The First Base, Singapura.

### Isolasi dan Konstruksi Gen VP-15 dengan Promoter T7

VP-15 diisolasi dari plasmid bakteri rekombinan menggunakan primer *forward* T7-VP-15 F: 5'-gaattaatcagactcactatagggagacgaggatccgatgacaaatccccgagaac-3 dan primer *reverse* T7-VP-15 R: 5'-gaattaatcagactcactatagggagaccggaattcttaacgccttgacttgcggg-3'. Konstruksi gen dilakukan dengan cara menambahkan sekuens promoter pada setiap primer. Amplifikasi DNA dilakukan pada mesin PCR, dengan menggunakan kit RTG sebagai reaksi PCR dan 1  $\mu\text{L}$  (50 pmol/mL) masing-masing primer dan  $\text{dH}_2\text{O}$  untuk mencapai volume akhir 25  $\mu\text{L}$ . Siklus suhu (*thermal cycle*) PCR yang digunakan mengikuti program isolasi gen penyandi VP-15 seperti yang dijelaskan sebelumnya. Amplicon PCR dielektroforesis pada gel agarosa (2,0% dalam 1X *TBE buffer*) untuk mengetahui keberhasilan konstruksi gen dengan indikator terbentuknya formasi fragmen DNA tunggal.

### Produksi Vaksin Rekombinan dsRNA VP-15

Vaksin rekombinan dsRNA VP-15 dihasilkan secara *in-vitro*, dilakukan menggunakan kit MEGAscript RNAi berdasarkan metode Loy *et al.* (2012). Konstruksi gen VP-15 dengan promoter T7 dari plasmid bakteri rekombinan dijadikan sebagai bahan dasar (*template* DNA) untuk memperbanyak vaksin rekombinan dsRNA. Proses produksi dsRNA melalui beberapa tahapan, yakni (a) memperbanyak dsRNA; (b) digesti dsRNA; dan (c) pemurnian dsRNA. Verifikasi produksi dsRNA dilakukan dengan metode elektroforesis.

### Aplikasi Vaksin Rekombinan dsRNA pada Udang Windu

Studi pendahuluan ini dilakukan dengan mengaplikasikan dosis tunggal dsRNA (0,2  $\mu\text{g}$ ) dan tanpa dsRNA sebagai perlakuan kontrol (injeksi larutan fisiologis). Vaksin dsRNA diinjeksi ke udang windu berukuran panjang  $14,75 \pm 3,17$  g dan bobot  $11,64 \pm 0,76$  cm melalui metode injeksi *inter-muscular*. Udang windu yang digunakan telah dinyatakan bebas dari penyakit bintik putih oleh infeksi WSSV. Hewan uji yang telah divaksin dipelihara pada bak fiber ukuran 250 L dengan kepadatan 10 ekor/bak menggunakan media air laut 32 ppt. Setelah lima hari vaksinasi, udang diuji tantang dengan WSSV dengan konsentrasi 50  $\mu\text{L}/shrimp$  melalui injeksi (berdasarkan data LC-50 pada penelitian sebelumnya), dan selanjutnya dipelihara dengan kepadatan dan wadah yang sama dengan saat vaksinasi. Sintasan diamati setiap hari selama lima

hari dan analisis histopatologi jaringan hepatopankreas dilakukan pada akhir penelitian.

### Analisis Data

Analisis sekuens menggunakan program GENETYX versi 7 untuk mendapatkan konsensus. Pensejajaran (*alignment*) nukleotida hasil pengklonan dilakukan dengan sekuens VP-15 yang tersimpan di GenBank dengan menggunakan program BLAST-N di NCBI. Sintasan udang setelah uji tantangan dianalisis dengan *t-test* untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan vaksin dengan kontrol. Data hasil isolasi, produksi vaksin rekombinan dsRNA, dan pensejajaran sekuens VP-15, serta histopatologi hepatopankreas udang windu disajikan secara deskriptif.

## HASIL DAN BAHASAN

### Isolasi dan Pengklonan Gen Pengkode VP-15 WSSV

Hasil ekstraksi genomik DNA dari daging udang windu yang positif terinfeksi WSSV menunjukkan tingkat kemurnian sebesar 1,87 yang dianggap cukup sesuai untuk amplifikasi DNA (Linacero *et al.*, 1998). Hasil isolasi gen penyandi VP-15 ditandai dengan fragmen tunggal DNA pada posisi berat molekuler sebesar 253 bp (Gambar 1). Berdasarkan indikator kemurnian DNA, dan ketepatan amplifikasi fragmen tunggal yang terbentuk, maka satu sampel dipilih untuk selanjutnya digunakan untuk keperluan pengkloningan.

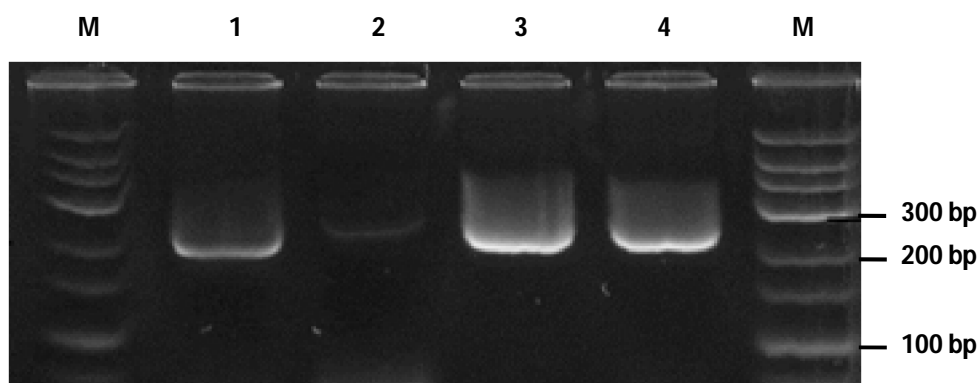
Setelah melalui proses pengkloningan, seleksi koloni bakteri kompeten berwarna putih yang tumbuh dilakukan dengan asumsi bahwa koloni putih membawa DNA sisipan dari gen target. Hal tersebut terjadi karena bakteri hasil transformasi telah

ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung antibiotik, IPTG (*isopropil tiogalaktosidase*), dan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -galaktopiranosida). IPTG merupakan bahan untuk menginduksi ekspresi gen penyandi enzim  $\beta$ -galaktosidase yang akan memecah X-gal, sehingga koloni berwarna biru. Sebaliknya, bakteri pembawa plasmid rekombinan tidak mampu memecah X-gal yang diindikasikan oleh munculnya koloni berwarna putih (Howe, 2007). Hasil elektroforesis empat koloni putih bakteri menunjukkan bahwa gen VP-15 telah terbukti tersisip di vektor kloning, yang dibuktikan dengan terbentuknya fragmen tunggal DNA pada posisi target gen 253 bp (Gambar 2).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengklonan gen VP-15 dapat dilakukan di vektor TOPO TA Cloning Kit. Keberhasilan pengklonan gen VP-WSSV pada vektor yang sama juga telah dilaporkan untuk VP-15, VP-19, VP-28, dan VP-35 (Seok *et al.*, 2004). Pengklonan gen VP-WSSV telah berhasil dilakukan pada vektor pGEM-T Easy (Liu *et al.*, 2001; Xing & Shi, 2011), pada vektor ekspresi pGEX-4T-2 (Mukhlis, 2010) dan vektor pUCm-T (Jha & Xu, 2005).

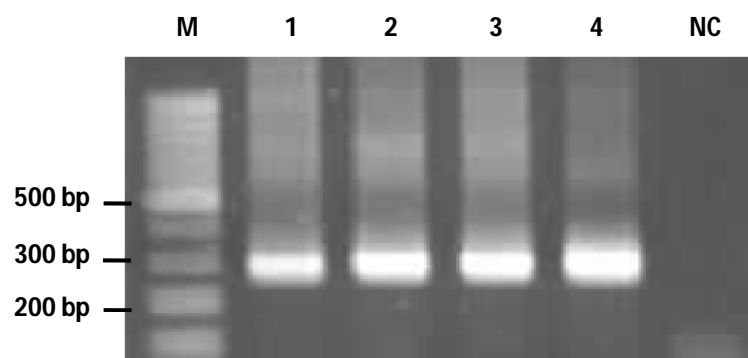
### Analisis Sekuens Nukleotida Gen Sisipan VP-15

Analisis sekuens nukleotida gen VP-15 dari koloni bakteri rekombinan pembawa plasmid TOPO-VP-15 telah dilakukan. Hasil pengurutan sekuens nukleotida dengan menggunakan target pembacaan *open reading frame* (ORF) sekitar 243 bp yang dimulai dengan adanya kodon awal "ATG" (*start codon*) dan diakhiri dengan kodon akhir "TAA" (*stop codon*) (Gambar 3). Karakterisasi gen VP-15 isolat dari Takalar, Indonesia yang mewabah pada tahun 2012, 2013, dan 2014 telah dilakukan oleh Parenrengi *et al.* (2017), yang



Gambar 1. Amplifikasi PCR dengan menghasilkan fragmen tunggal gen VP-15 yang diisolasi dari genomik udang windu (M= marker DNA 100 bp; 1-4= sampel udang).

Figure 1. PCR amplification by generating a single fragment of VP-15 gene isolated from genomic DNA of tiger shrimp (M= DNA marker 100 bp; 1-4= shrimp sample).



Gambar 2. Fragmen DNA dengansisipan gen pengkode VP-15 dalam plasmid bakteri rekombinan (M= marker DNA dan 1-4= sampel koloni bakteri).

Figure 2. DNA fragment of a gene encoding VP-15 inserted in plasmid of recombinant bacteria (M= DNA marker and 1-4= samples of colonies bacteria).

mengungkapkan bahwa gen VP-15 tersusun dari 80 asam amino, terdapat dua kodon awal, satu kodon akhir, satu *Kozak context* (AAAATGG) dan *N-terminal sequence*, serta kaya dengan asam amino lisina (21,3%), arginina (22,9%), dan serina (24,6%). Selain itu, karakterisasi gen VP-15 juga telah dilaporkan oleh Van-Hulten *et al.* (2002).

Hasil analisis dengan menggunakan Blast-N (diakses secara *online* di website [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) menunjukkan bahwa OFR gen VP-15 pada penelitian ini memiliki tingkat kemiripan sampai dengan 99% dengan isolat WSSV dari Cina (KY827813.1, KT995472.1, KT995471.1, KT995470.1, AF332093.3, AF227910.1, dan

AY249449.1), Meksiko (KT957060.1, KT957057.1, KT957056.1, KU216744.1, AJ937742.1, KT957059.1, KT957058.1, dan AY713371.1), India (DQ681072.1), Korea (JX515788.1 dan AY374120.1), dan Mesir (KR083866.1). Hasil ini mengindikasikan bahwa isolat WSSV yang menginfeksi udang windu memiliki kekerabatan (filogenetik) yang relatif dekat dengan isolat dari beberapa negara seperti Asia dan Amerika Latin. Hidayani *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa isolat WSSV (VP-19) yang menginfeksi udang vaname di Indonesia memiliki kerabatan yang dekat dengan isolat WSSV dari Meksiko. Kemiripan sekuens gen VP-19 WSSV isolat Situbondo dengan isolat Indonesia lainnya maupun dari negara-negara lain mencapai 98% (Alim *et al.*, 2011).

```

ATG ACA AAA TAC CCC GAG AAC AAA AGA TTG TTG TCT AGG AAC AAA
GAA ACA TTA AAA ATG GTT GCC CGA AGC TCC AAG ACC AAA TCC CGC
CGT GGA AGC AAG AAG AGG TCC ACC ACT GCT GGA CGC ATC TCC AAG
CGG AGG AGC CCA TCA ATG AAG AAG CGT GCA GGA AAG AAG AGC TCC
ACT GTC CGT CGC CGC TCC TCA AAG AGC GGA AAG AAG TCT GGA GCC
CGC AAG TCA AGG CGT TAA
    
```

Gambar 3. Sekuens ORF gen pengkode VP-15 WSSV yang disolasi dari udang windu (Kodon awal=garis bawah, kondon akhir= huruf miring, A= adenina, C= sitosina, G= guanina, T= timina).

Figure 3. ORF sequences of a gene encoding VP-15 isolated from tiger shrimp (Start codon= underlined letters, stop codon= italic letters, A= adenine, C= cytosine, G= guanine, T= thymine).

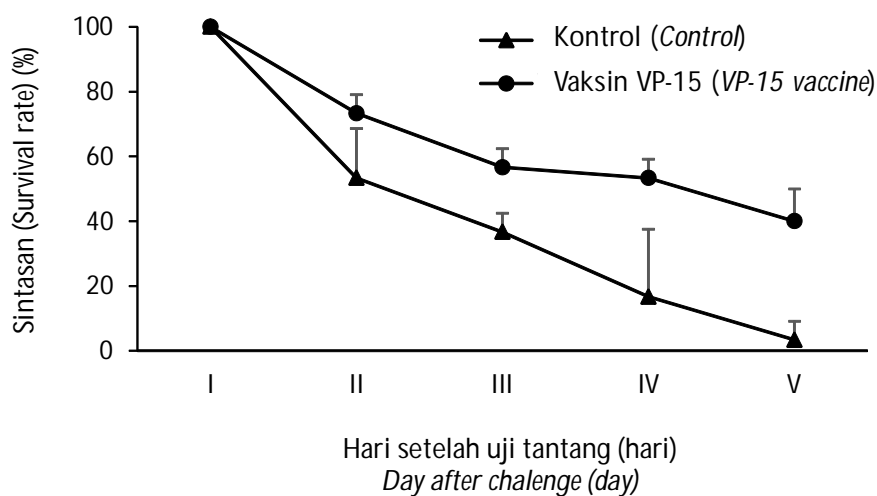
### Aplikasi Vaksin Rekombinan dsRNA VP-15

Vaksin rekombinan VP-15 telah berhasil diproduksi secara *in-vitro* menggunakan kit MEGAscript RNAi dengan tingkat kemurnian yang sangat tinggi yakni 1,87 dengan konsentrasi 23.200 µg/mL. Linacero *et al.* (1998) merekomendasikan tingkat kemurnian DNA untuk keperluan analisis molekuler adalah 1,8-2,0. Keberhasilan produksi tersebut diverifikasi keberadaan fragmen gen VP-15 yang telah dikonstruksi dengan promotor T7 melalui teknik elektroforesis. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Wulandari (2010) bahwa produksi dsRNA dari gen *gonad inhibiting hormone* (GIH) dapat dilakukan secara *in-vitro* dengan menggunakan kit MEGAscript RNAi. Hasil konstruksi promotor dan gen VP-15 (T7-VP-15) dijadikan sebagai bahan vaksin rekombinan yang diinjeksikan ke udang windu sebelum dilakukan uji tantangan. Hasil pengamatan sintasan hewan uji pasca-vaksinasi menunjukkan adanya kematian yang tidak berarti (1-2 ekor), baik pada perlakuan dengan vaksin dsRNA maupun pada injeksi larutan fisiologis (kontrol), kematian diduga bukan karena vaksin dsRNA tetapi hanya karena pengaruh adanya tekanan penanganan injeksi *intra-muscular*.

Pengamatan terhadap sintasan udang windu setelah uji tantangan sampai dengan hari ke-5 memperlihatkan bahwa vaksin rekombinan VP-15 menghasilkan 40,0% atau mampu meningkatkan sintasan udang windu hingga 36,7% dibandingkan dengan tanpa penggunaan vaksin atau kontrol hanya sebesar 3,3% (Gambar 4) atau setara dengan nilai RPS (*relative percentage survival*) sebesar 37,9%. Hasil analisis *t-test* menunjukkan bahwa sintasan udang yang diberi vaksin VP-15

berbeda nyata dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

Tingginya sintasan udang windu yang divaksin dibandingkan dengan yang tidak divaksin menunjukkan bahwa VP-15 diduga memberikan perlindungan terhadap infeksi WSSV. Pendapat tersebut sejalan dengan pernyataan Underwood *et al.* (2013) yang menyebutkan bahwa gen VP-15 memiliki homologi yang tinggi dengan protein-protein histon; oleh karena itu, protein ini diperkirakan memiliki peran dalam pengikat DNA WSSV, membentuk poros nukleoprotein (*nucleoprotein core*) dan berperan dalam infeksi sistemik pada udang, dan dapat menstimulasi munculnya sistem kekebalan pada udang windu. Nilai RPS pada penelitian ini relatif sama dengan hasil penelitian Witteveldt *et al.* (2004b) pada udang windu dengan menggunakan vaksin VP-28 dan campuran VP-28 + VP-19 dengan nilai masing-masing adalah 44% dan 33% pada pengamatan uji tantangan pada hari ke-2 setelah vaksinasi. Namikoshi *et al.* (2004) melaporkan bahwa aplikasi vaksin VP-26 dan VP-28 pada udang *P. japonicus* dapat meningkatkan resistensinya dengan nilai RPS masing-masing 80% dan 95%, sedangkan aplikasi dsRNA VP-28 pada *Macrobrachium rosenbergii* menghasilkan RPS sebesar 44,5% terhadap WSSV (Jariyapong *et al.*, 2015). Vaksinasi melalui pakan pada udang windu dengan menggunakan VP-19 dapat meningkatkan sintasan dengan nilai RPS sebesar 77% pada hari ke-7 dan 29% pada hari ke-21 setelah uji tantangan dengan WSSV (Witteveldt *et al.*, 2004a). Penggunaan vaksin dsRNA dengan dosis 2,0 µg pada udang *L. vannamei* dapat meningkatkan sintasan 100% melawan IHNV (Loy *et al.*, 2012). Udang *L. vannamei* yang diinjeksi dengan plasmid yang mengandung VP-28, VP-39, dan wsv-477 memperlihatkan sintasan masing-masing 50%, 60%,



Gambar 4. Sintasan kumulatif udang windu *Penaeus monodon* yang diuji tantang dengan WSSV.

Figure 4. Cumulative survival rate of tiger shrimp *Penaeus monodon* challenged with WSSV.

dan 90% dibandingkan dengan kontrol (0%) pada hari ke-9 setelah ditantang dengan WSSV (Akhila *et al.*, 2015). Peningkatan resistensi udang windu terhadap WSSV dengan teknologi transgenesis juga telah dilaporkan oleh Parenrengi (2010) dengan sintasan 24,5% lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya induksi resistensi udang windu setelah diinjeksi dengan vaksin rekombinan (dsRNA) yang diduga akibat adanya mekanisme penghambatan (interferensi) infeksi virus. Reshi *et al.* (2014) dan Mocellin & Provenzano (2004) menyatakan bahwa mekanisme perlindungan yang terjadi pada saat dsRNA diinjeksi ke dalam sel target, tidak secara langsung memicu *shutdown* transkripsi dan translasi protein, tetapi melalui beberapa proses, antara lain: (a) pemotongan untai ganda oleh enzim RNase-III menjadi *small interfering RNA* (siRNA) sehingga memicu terjadinya RNAi pada sel target, (b) siRNA akan berikatan dengan kompleks protein RISC (*RNA-induced silencing complex*) yang akan memandu mengenal mRNA yang berisi sekuens homolog sehingga dapat berkomplemen, selanjutnya mRNA akan terdegradasi, dan (c) ekspresi gen secara spesifik menjadi in-aktif pada tahap post-transkripsi. Hasil penelitian Robalino *et al.* (2005), mengungkapkan bahwa imun antivirus yang diberi dsRNA akan melawan infeksi virus tidak hanya pada jalur imun alami (*innate immune*) tetapi juga melalui mekanisme *RNAi-like* untuk menginduksi potensi respons antivirus secara *in-vivo*.

Dukungan histopatologi dilakukan pada jaringan hepatopankreas untuk mengetahui hubungan antara kerusakan jaringan akibat infeksi virus dengan rendahnya sintasan udang windu yang tidak divaksin. Pengamatan histopatologi udang uji pada aplikasi vaksin VP-15 menunjukkan bahwa jaringan hepatopankreas udang tanpa vaksin mengalami

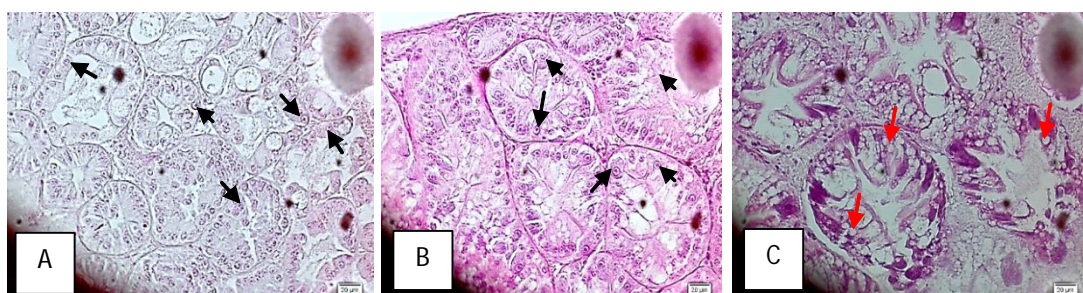
abnormalitas bila dibandingkan dengan kontrol negatif dan udang yang diberi vaksin (Gambar 5). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hepatopankreas udang windu tanpa vaksin mengalami tingkat kerusakan inti sel yang lebih akut oleh adanya infeksi WSSV dibandingkan udang yang divaksin dengan VP-15. Kerusakan jaringan hepatopankreas udang windu akibat adanya infeksi WSSV telah dilaporkan oleh Firmansyah (2002) dan Rahmawati (2002) yang ditandai adanya badan inklusi yang sentronuklear, eosinofilik, dan terpisah dari membran sel, kemudian benang-benang kromatin menepi.

## KESIMPULAN

Gen penyandi VP-15 berhasil dikloning dan menghasilkan vaksin rekombinan secara *in-vitro*. Analisis nukleotida VP-15 menunjukkan kemiripan yang tinggi (99%) dengan sekuens nukleotida VP-15 pada GenBank. Penggunaan vaksin rekombinan dosis 0,2 µg memperlihatkan sintasan udang windu yang lebih tinggi mencapai 36,7% dibandingkan dengan tidak menggunakan vaksin. Ke depan, nampaknya ada peluang dan potensi besar untuk menghasilkan vaksin rekombinan dari gen VP-15 dalam upaya mencegah terjadinya infeksi WSSV pada budidaya udang windu.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas dukungan anggaran APBN-2016 dari DIPA Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan. Terima kasih disampaikan kepada Ibu Dr. Hessy Novita dan Bapak Johan Effendi atas pendampingannya selama proses pengklonan gen, dan ucapan terima kasih juga disampaikan kepada peneliti dan teknisi litkayasa dan non-litkayasa BRPBAPPP, Maros atas bantuannya dalam penelitian ini.



Gambar 5. Gambaran histopatologi hepatopankreas udang windu yang ditantang dengan WSSV (skala bar= 20 µm; A= kontrol negatif; B= udang dengan vaksin; C= udang tanpa vaksin; dan tanda panah hitam menunjukkan inti sel normal, dan tanda panah merah menunjukkan lisis inti sel).

Figure 5. Histopathology profile of tiger shrimp challenged with WSSV (bar scale= 20 µm; A= negative control; B= shrimp with vaccine; and C= shrimp without vaccine, and black arrow indicates normal cell and red arrow indicates lysis cell).

## DAFTAR ACUAN

- Akhila, D.S., Mani, M.K., Rai, P., Condon, K., Owens, L., & Karunasagar, I. (2015). Antisense RNA mediated protection from *white spot syndrome virus* (WSSV) infection in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 435, 306-309.
- Alim, S., Wahyuningrum, D., & Ali, M. (2011). Pengklonan dan pengurutan gen penyandi protein permukaan VP19 WSSV isolat Situbondo. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10(2), 154-164.
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K., & Phongdara, A. (2004). Effect of fucosidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, 223, 23-30.
- Firmansyah, A. (2002). *Uji patogenitas white spot syndrome virus (WSSV) pada udang windu (Penaeus monodon Fabr.)*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 88 hlm.
- Hidayani, A.A., Tassakka, A.C.M.A.R., & Parenrengi, A. (2016). Isolation and characterization of an envelope protein (VP19) of a *White Spot Syndrome Virus* from diseased *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *AACL Bioflux*, 9(2), 389-395.
- Howe, C. (2007). *Gene cloning and manipulation*. Second edition. United Kingdom: Cambridge University Press, 266 pp.
- Jariyapong, P., Chotwiwatthanakun, C., Direkbusarakom, S., Hirono, I., Wuthisuthimethavee, S., & Weerachatanukul, W. (2015). Delivery of double stranded RNA by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus-like particles to protect shrimp from *white spot syndrome virus*. *Aquaculture*, 435, 86-91.
- Jha, R.K. & Xu, Z. (2005). Production of recombinant enveloped structural proteins from the chinese wssv isolate. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 20(2), 136-141.
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y., & Kim, J.W. (2004). Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture*, 237, 21-30.
- Linacero, R., Rueda, J., & Vazquez, A.M. (1998). Quantification of DNA. In *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals* (p.18-21). London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall.
- Liu, W.J., Yu, H.T., Peng, S.E., Chang, Y.S., Pien, H.W., Lin, C.J., Huang, C.J., Tsai, M.F., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin, J.Y., Lo, C.F., & Kou, G.H. (2001). Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. *Virology*, 289, 362-377.
- Loy, J.D., Mogler, M.A., Loy, S.S., Janke, B., Kamrud, K., Scura, E.D., Harris, D.L.H., & Bartholomay, L.C. (2012). dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of General Virology*, 93, 880-888.
- Mocellin, S. & Provenzano, M. (2004). RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*, 2(39), 6.
- Mukhlis, A. (2010). *Pengklonan gen VP28 penyandi viral protein-28 dari virus white spot syndrome sebagai langkah awal produksi vaksin rekombinan udang penaeid*. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 80 hlm.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., & Muroga, K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicas* to induce resistance to *white spot syndrome virus*. *Aquaculture*, 229(1), 25-35.
- Parenrengi, A. (2010). *Peningkatan resistensi udang windu Penaeus monodon terhadap penyakit white spot syndrome virus melalui transfer gen Penaeus monodon antiviral*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 108 hlm.
- Parenrengi, A., Alimuddin, & Tenriulo, A. (2017). Characteristic of a viral protein (VP-15) of *white spot syndrome virus* isolated from infected tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Indonesian Aquaculture Journal*, 12(2), 67-75
- Rahmawati, R. (2002). *Uji patogenitas white spot syndrome virus (WSSV) pada udang windu (Penaeus monodon Fabr.) melalui metode perendaman dengan konsentrasi 200 µg/mL selama 30, 60, dan 90 menit*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 80 hlm.
- Reshi, M.L., Wu, J.L., Wang, H.V., & Hong, J.R. (2014). RNA interference technology used for the study of aquatic virus infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 40, 14-23.
- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*, 78(19), 10442-10448.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., & Warr, G.W. (2005). Double-stranded RNA induces



- sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *Journal of Virology*, 79(21), 13561-13571.
- Sarathi, M., Simon, M.C., Venkatesan, C., Thomas, J., Ravi, M., Madan, N., Thiyagarajan, S., & Hameed, A.S.S. (2010). Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of *white spot syndrome virus* (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. *Journal of Fish Diseases*, 33, 603-607.
- Seok, S.H., Park, J.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., & Park, J.H. (2004). Cloning and sequencing of envelope proteins (VP19, VP28) and nucleocapsid proteins (VP15, VP35) of a *white spot syndrome virus* isolate from Korean shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 85-88.
- Underwood, D.J., Cowley J.A., & Johnson, K.N. (2013). Antiviral immunity and protection in penaeid shrimp. *Review Article, Versita, Invertebrate Immunity*, p. 2-14.
- van-Hulten, M.C.W., Reijns, M., Vermeesch, A.M.G., Zandbergen, F., & Vlak, J.M. (2002). Identification of VP19 and VP15 of *white spot syndrome virus* (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal Gen Virology*, 83, 257-265.
- Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M., & van Hulten, M.C.W. (2004a). Protections of *Penaeus monodon* against *white spot syndrome virus* by oral vaccination. *Journal Virology*, 78, 2057-2061.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., & van-Hulten, M.C.W. (2004b). Protection of *Penaeus monodon* against *white spot syndrome virus* using a WSSV subunit vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 571-579.
- Wulandari, A.S. (2010). *Konstruksi dan produksi dsRNA gonad-inhibiting hormone udang windu (Penaeus monodon) secara in vitro dan in vivo pada vektor ekspresi L4440*. Tesis. Program Studi Magister Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung.
- Xing, Y. & Shi, Z. (2011). Nucleocapsid protein VP15 of *white spot syndrome virus* colocalizes with the nucleolar proteins nucleolin and fibrillarin. *Canadian Journal Microbiology*, 57, 759-764.