

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

## RESPONS IMUN UDANG WINDU *Penaeus monodon* TERHADAP VAKSIN dsRNA VP-24 PADA DOSIS BERBEDA

Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum<sup>#</sup>, Andi Parenrengi, Bunga Rante Tampangallo, dan Ike Trismawanti

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan

(Naskah diterima: 10 November 2017; Revisi final: 12 Februari 2018; Disetujui publikasi: 12 Februari 2018)

### ABSTRAK

Peningkatan produksi udang windu *Penaeus monodon* terus diupayakan, salah satunya dengan peningkatan respons imun udang terhadap infeksi penyakit WSSV. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun udang terhadap pemberian vaksin dsRNA VP-24 pada berbagai dosis. Konstruksi vaksin dsRNA VP-24 dilakukan menggunakan Megascript kit dengan DNA genom VP-24 sebagai *template*. Vaksinasi dilakukan dengan metode injeksi pada udang windu yang berukuran rata-rata  $15,88 \pm 3,50$  g; dosis vaksin yang diujikan adalah  $0,02 \mu\text{g}$ ;  $0,2 \mu\text{g}$ ;  $2 \mu\text{g}$ ; dan sebagai kontrol adalah udang yang tidak diberi vaksin. Penelitian terdiri atas empat perlakuan dosis vaksin dengan masing-masing dua ulangan dan dipelihara selama lima hari. Uji tantang dilakukan selama enam hari dengan menginjeksi virus WSSV dalam *saline solution* (1:3 v/v). Pengamatan terhadap sintasan udang windu dilakukan setiap hari, sedangkan penghitungan total hemocyte (THC) dan ProPO diamati pada hari I, III, dan VI setelah diinfeksi WSSV. Pada akhir pengujian dilakukan pengambilan jaringan hepatopankreas untuk analisis histopatologi. Analisis data dilakukan secara statistik dengan analisis ragam (ANOVA). Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa injeksi vaksin dsRNA VP-24 dengan dosis  $0,2 \mu\text{g}$  memiliki pengaruh yang signifikan terhadap sintasan dan respons imun udang windu ( $P < 0,05$ ). Vaksin dsRNA VP-24 dengan dosis  $0,2 \mu\text{g}$  mampu memberikan sintasan udang windu *P. monodon* sebesar 65% dan meningkatkan respons imun udang dengan THC ( $1.550 \times 10^6$  sel/mL) dan ProPO (0,042 Abs).

**KATA KUNCI:** dsRNA; VP-24; *P. monodon*; WSSV; dosis

**ABSTRACT:** *Response immune of black tiger shrimp Penaeus monodon to dsRNA VP-24 vaccine on different doses. By: Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum, Andi Parenrengi, Bunga Rante Tampangallo, and Ike Trismawanti*

One of the efforts to increase the production of tiger shrimp *Penaeus monodon* is increasing the immune response against WSSV disease. This study aims to evaluate shrimp immune response to dsRNA VP-24 vaccination at various doses. The construction of dsRNA VP-24 vaccine was performed using Megascript kit with the VP-24 DNA genome as a template. The vaccination was done by injection method on shrimp sized  $15.88 \pm 3.50$  g. The tested vaccine doses (treatments) were  $0.02 \mu\text{g}$ ;  $0.2 \mu\text{g}$ ;  $2 \mu\text{g}$ ; and unvaccinated shrimp as the control. The study consisted of four treatments of vaccine doses with two replicates for each treatment. The challenge test was performed by injecting the WSSV virus in saline solution (1:3 v/v). The observation on shrimp survival rate was done daily, while the total hemocyte count (THC) and ProPO observation were performed on the 1st day, 3rd day, and 6th day after WSSV infection. At the end of the experiment, samplings of hepatopancreas for analysis were performed. Data were statistically analyzed using ANOVA. The present study indicated that the injection of  $0.2 \mu\text{g}$  dsRNA VP-24 vaccine had a significant effect on the survival rate and immune response of shrimp ( $P < 0.05$ ). The dose of  $0.2 \mu\text{g}$  dsRNA VP-24 had resulted in 65% of survival rate and increased immune response of *P. monodon* with THC ( $1,550 \times 10^6$  cell/mL) and ProPO (0.042 Abs).

**KEYWORDS:** dsRNA; VP-24; *P. monodon*; WSSV; dose

<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: [mulyaningrum@kkp.go.id](mailto:mulyaningrum@kkp.go.id)

## PENDAHULUAN

Udang merupakan salah satu sumberdaya perikanan yang bernilai ekonomis tinggi yang banyak dibudidayakan terutama udang vaname *Litopenaeus vannamei* dan udang windu *P. monodon* (Tassanakajon *et al.*, 2013). Kemampuan replikasi yang cepat dan virulensi patogen yang ekstrem menjadikan WSSV sebagai isu global. Invertebrata seperti udang tidak memiliki limfosit dan antibodi fungsional (imunoglobulin) dan karenanya sistem kekebalan tubuh udang dikenal sebagai sistem kekebalan 'non-spesifik' atau 'bawaan'. Pada arthropoda, udang merupakan satu di antara spesiesnya, mengandalkan sistem kekebalan bawaan, yang terdiri atas sistem kekebalan humoral dan seluler terhadap infeksi virus (Li & Xiang, 2013). Pada invertebrata, vaksin berfungsi sebagai stimulan kekebalan tubuh non-spesifik (Rowley & Pope, 2012).

Virus WSSV merupakan virus *double-stranded* DNA (dsDNA) terbentuk dari makromolekul kompleks yang secara spesifik melekat dan disusun untuk perlindungan dan transfer genom virus. Gen-gen WSSV yang ditranskripsikan pada fase lanjut (*late phase*) meliputi gen-gen yang menyandi protein struktural utama WSSV yaitu VP-28, VP-26, VP-24, VP-19, dan VP-15. Viral protein ini berpeluang untuk dijadikan sebagai vaksin rekombinan (Sánchez-Paz, 2010). Teknologi interferensi RNA (RNAi) merupakan teknik vaksinasi DNA rekombinan yang spesifik dan efektif untuk menghambat replikasi virus dengan introduksi *small interference* (si)RNA maupun *double-stranded* (ds)RNA pada target gen virus (Haq *et al.*, 2012; Jayachandran *et al.*, 2012; Thammasorn *et al.*, 2015). Teknologi vaksinasi menggunakan agen virus dsRNA berkembang sangat pesat terutama dibidang medis, pertanian, dan akuakultur (Jin *et al.*, 2010; Lichner *et al.*, 2003; Rowley & Pope, 2012). Di bidang akuakultur, teknologi ini banyak dikembangkan untuk menanggulangi penyakit yang disebabkan oleh virus pada udang (Mejía-Ruiz *et al.*, 2011; Ahanger *et al.*, 2014). Beberapa penelitian vaksinasi udang menggunakan agen WSSV sebagai sumber vaksin telah menunjukkan kemajuan dan memperoleh hasil yang menggembirakan (Huang *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Puneeth *et al.*, 2017).

Isolasi dan karakterisasi gen virulen WSSV VP-24, telah berhasil dilakukan (Tenriulo *et al.*, 2015), namun pemanfaatannya sebagai vaksin dsRNA untuk meningkatkan respons imun udang windu masih memerlukan kajian yang lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun udang windu *Penaeus monodon* terhadap pemberian vaksin dsRNA VP-24 dengan dosis yang berbeda secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Persiapan Vaksin dsRNA VP-24

Tahapan dalam konstruksi vaksin dsRNA VP-24 sesuai prosedur Megascript RNAi Kit meliputi: persiapan *template* DNA, produksi dsRNA, *nuclease digestion*, dan purifikasi.

### Persiapan *Template* DNA

Cetakan DNA (*template*) dikonstruksi dari DNA genom VP-24 yang telah diisolasi dari udang windu dengan teknik PCR. Isolasi menggunakan primer T7 VP-24 (Sarathi *et al.*, 2010) : VP-24 *forward* : 5'-TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CGC GGA TCC GAT GCA CAT GTG GGG GGT TTA C-3'. VP-24 *reverse* : 5'-TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCG GAA TTC TTA TTT TTC CCC AAC CTT AAA CAG-3'.

Amplifikasi fragmen DNA dilakukan pada *thermocycler* (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystem) dengan suhu *annealing* 72°C menggunakan kit *PureTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare). Sebanyak 1 µL genom VP-24 sebagai *template* direaksikan dengan primer mix (primer T7 VP-24 *reverse* dan *forward* masing-masing 1 µL) dan dH<sub>2</sub>O hingga volume total 25 µL., amplicon selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan teknik elektroforesis menggunakan marker 100 bp pada gel agarose 2% pada tegangan 50 volt selama dua jam. Amplicon yang diperoleh kemudian digunakan sebagai bahan untuk memproduksi vaksin dsRNA.

### Produksi dsRNA

Amplicon sebanyak 1-2 µg direaksikan dengan ATP, CTP, GTP, UTP, 10x T7 *reaction buffer* (37°C), T7 *enzyme mix*, dan *nuclease free water* sesuai prosedur Megascript RNAi Kit. Larutan yang diperoleh diinkubasi pada 37°C selama enam jam, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada 75°C selama lima menit. dsRNA yang diperoleh kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 3-4 jam, selanjutnya disimpan pada suhu -20°C atau -80°C.

### *Nuclease Digestion*

Sebanyak 20 µL dsRNA yang dihasilkan direaksikan dengan *nuclease free water*, 10x *digestion buffer*, DNase, dan RNase. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam dan dsRNA yang dihasilkan kemudian dipurifikasi.

### Purifikasi dsRNA

Purifikasi dsRNA dilakukan dengan mereaksikan 50 µL dsRNA dengan *nuclease free water*, 10x *binding buffer*, dan etanol 100%. Kemudian dilakukan

sentrifugasi, untuk memisahkan supernatan dan homogenat. Homogenat yang diperoleh dicuci dengan *wash solution* dan *disentrifuge*, homogenat yang diperoleh kemudian diberi elution solution (95°C) dan *disentrifuge* kembali. Supernatan yang diperoleh merupakan dsRNA murni sebagai bahan vaksin. Hasil dsRNA yang diperoleh merupakan bahan vaksin dsRNA VP-24 yang akan diaplikasikan pada hewan uji.

#### **Vaksinasi Udang Windu dengan Vaksin dsRNA VP-24**

Vaksinasi dilakukan dengan metode injeksi intramuskular pada udang windu berukuran rata-rata (15,88 ± 3,50 g) dan panjang rata-rata (11,91 ± 1,11 cm). Dosis vaksin yang diujikan merujuk pada penelitian Loy *et al.* (2012) yakni: 0,02 µg/ekor; 0,2 µg/ekor; dan 2 µg/ekor dan udang yang diinjeksi dengan *saline solution* (SS) tanpa vaksin sebagai kontrol. Udang yang telah divaksin dipelihara pada bak terkontrol yang berukuran 80 cm x 80 cm x 60 cm yang dilengkapi dengan aerasi, dengan kepadatan 10 ekor/bak sebanyak tiga ulangan. Pemeliharaan dilakukan selama lima hari, kemudian dilakukan pengukuran THC dan proPO sebagai data awal sebelum dilakukan ujiantang.

#### **Pengujian Respons Imun Udang Windu**

Ujiantang dilakukan lima hari setelah injeksi vaksin dsRNA VP-24, pengujian dilakukan pada delapan buah bak terkontrol berukuran 80 cm x 80 cm x 60 cm yang dilengkapi dengan aerasi. Setiap bak diisi dengan 10 ekor udang windu yang telah diberi perlakuan dosis vaksin dengan dua ulangan untuk setiap perlakuan. Udang windu yang telah divaksin dengan dosis sesuai perlakuan kemudian diinjeksi dengan virus WSSV yang telah dikonfirmasi patogenitasnya. Virus WSSV diperoleh dari hemolim udang windu yang terinfeksi WSSV. Hemolim kemudian *disentrifuge* pada 3.000 g selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh diambil dan *disentrifuge* kembali pada 8.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian difilter dengan menggunakan *cellulose nitrate membrane filter* 0,2 µm. Hasil yang diperoleh disimpan dalam *biofreezer* (-80°C) sebagai stok virus WSSV. Stok WSSV kemudian diencerkan dengan SS perbandingan 1:3 (v/v) dan diinjeksikan ke udang dengan volume 100 µL/ekor.

Pengamatan terhadap udang yang telah diinfeksi WSSV dilakukan selama enam hari. Sintasan udang diamati setiap hari, sedangkan pengamatan terhadap THC dan proPO dilakukan pada awal sebelum injeksi WSSV, hari ke-1, 3, dan 6. Pengamatan proPO didasarkan pada pengukuran absorbansi menggunakan L-DOPA sebagai substrat. Hemolim udang diberi

antikoagulan Trisodium citrate 3,8% kemudian *disentrifuge* pada suhu 4°C dengan kecepatan 1.000 rpm selama 20 menit. Homogenat yang diperoleh dilarutkan dengan *cocodylate citrate buffer* dan *disentrifuge*, prosedur ini diulang hingga dua kali dan homogenat yang diperoleh dibagi dua. Satu sampel homogenat digunakan untuk pengukuran tripsin dan satu sampel yang lain untuk pengukuran LDOPA. Masing-masing sampel diukur absorbansinya pada spektra 490 nm. Pada akhir pengujian dengan WSSV, dilakukan pengambilan sampel hepatopankreas untuk analisis histopatologi.

Penelitian dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan analisis ragam (ANOVA), dengan empat perlakuan dan dua ulangan untuk masing-masing perlakuan dosis vaksin. Data histologi dianalisis secara deskriptif.

### **HASIL DAN BAHASAN**

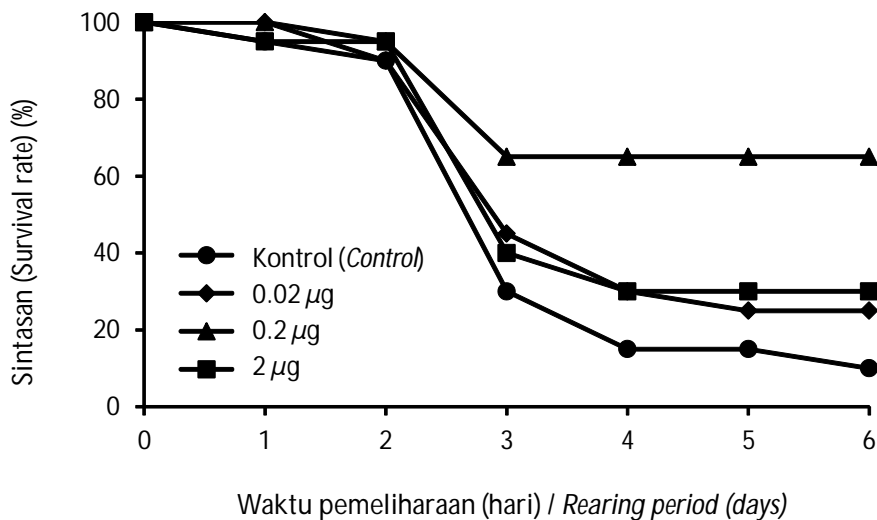
#### **Sintasan Udang Windu**

Pengamatan terhadap sintasan udang windu selama ujiantang memperlihatkan pemberian vaksin VP-24 dengan dosis 0,2 µg mampu meningkatkan sintasan udang sebesar 65% dibandingkan kontrol (10%) (Gambar 1). Hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa pemberian vaksin dsRNA VP-24 memberikan pengaruh yang signifikan terhadap sintasan udang ( $P < 0,05$ ).

Penelitian terdahulu oleh Krishnan *et al.* (2009) melaporkan bahwa konstruksi vaksin DNA rekombinan mampu memproteksi udang windu hingga 62% terhadap serangan WSSV. Sarathi *et al.* (2010) memperoleh mortalitas kumulatif udang windu *P. monodon* sebesar 37% dengan injeksi dsRNA VP-24. Sintasan yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dari hasil yang diperoleh oleh Puneeth *et al.* (2017) yang memperoleh sintasan udang windu sebesar 50% dengan injeksi vaksin VP-24 *in vivo* dengan dosis 2,5 µg/g bobot udang.

Fungsi VP-24 pada siklus hidup WSSV belum banyak diketahui, VP-24 terbukti tidak dapat mengikat membran sel inang. Hasil penelitian terdahulu membuktikan adanya interaksi langsung VP-24 dan VP-28 masing-masing membentuk kompleks protein dan berpartisipasi dalam infeksi virus secara bersama-sama. Menurut Chen *et al.* (2007), gen penyandi VP-24 memiliki peran sebagai penghubung protein struktural dari protein VP-28, VP-26, WSV-10, dan protein lain untuk membentuk ikatan kompleks pada amplop virus. Anti-VP-24 IgG dapat mencegah serangan WSSV secara signifikan (Xie & Yang, 2006).

Gen VP-24 memiliki homologi yang tinggi dengan sekuens protein-protein histon sehingga protein ini



Gambar 1. Sintasan udang windu pada aplikasi vaksin dsRNA VP-24 secara *in vitro*.

Figure 1. Survival rate of *P. monodon* on *in vitro* dsRNA VP-24 vaccine application.

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 (Underwood *et al.*, 2013).

Pada hewan akuatik terutama krustasea, mekanisme interferensi RNA terjadi pada beberapa tahap, pada saat dsRNA diinduksi ke dalam sel target terlebih dahulu terjadi pembentukan siRNA yang kemudian mendegradasi mRNA sehingga ekspresi gen secara spesifik menjadi inaktif pada tahap post-transkripsi (Reshi *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015).

#### Total Hemocyte Count (THC)

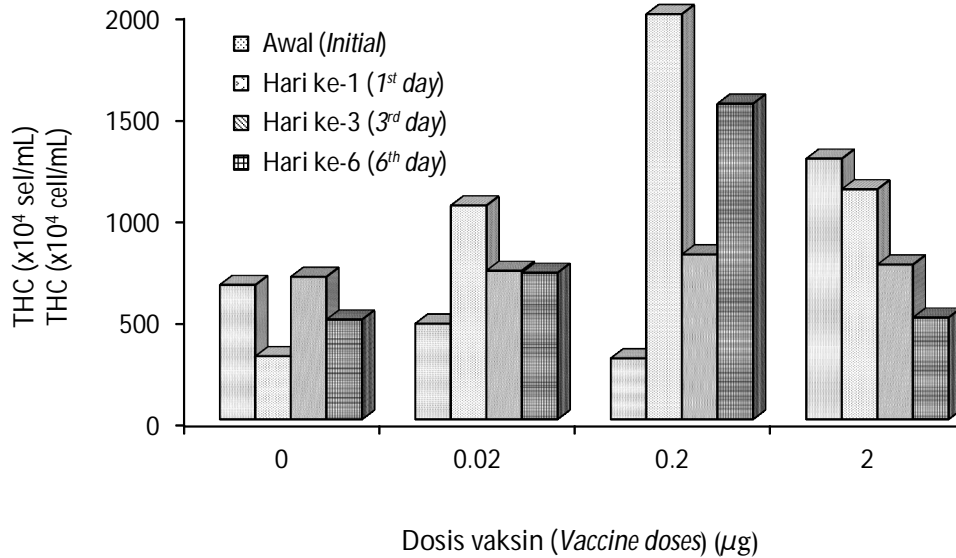
Hasil penghitungan total hemosit (THC) nampak terjadi adanya peningkatan pada udang windu yang diberi vaksin dsRNA VP-24 (Gambar 2).

Jumlah hemosit tertinggi diperoleh pada pemberian vaksin sebesar 0,2 µg ( $1.550 \times 10^4$  sel/mL) dan terendah pada kontrol ( $490 \times 10^4$  sel/mL). Pemberian vaksin dsRNA VP-24 terhadap udang windu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penghitungan jumlah hemosit, THC ( $P < 0,05$ ). Pada kontrol terjadi penurunan THC setelah dilakukan ujiantang (Gambar 3). Menurut Yeh *et al.* (2009), terjadinya penurunan THC pasca ujiantang disebabkan oleh bermigrasinya sel hemosit dari sistem sirkulasi tubuh menuju jaringan, dengan banyaknya sel yang terinfeksi. Infeksi WSSV yang berada pada fase kritis menyebabkan terjadinya reaksi sel-sel hemosit untuk melakukan berbagai mekanisme

pertahanan tubuh yang terdiri atas proses pengenalan patogen, fagositosis, melanisasi, dan sitotoksitas. Pada pemberian vaksin dengan dosis 2 µg juga terjadi penurunan jumlah THC, menurut Harikrishnan *et al.* (2011) pemberian imunostimulan melebihi dosis optimal dapat menyebabkan immunosupresi pada udang uji, tetapi dapat memproteksi ikan/udang terhadap serangan penyakit. Efektor utama sel-sel sistem kekebalan tubuh pada krustasea adalah hemosit, sementara hepatopankreas bertanggung jawab untuk biosintesis dari beberapa faktor humoral. Peningkatan sel-sel hemosit dalam tubuh udang berperan penting dalam menghambat atau menghancurkan patogen yang masuk ke dalam tubuh udang. Pada udang, seperti dalam krustasea lainnya, terdapat tiga jenis utama hemosit (sel darah) yakni sel hialin, sel semi-granular dan sel granular (granulosit), yang semuanya berperan dalam kekebalan tubuh dan pertahanan terhadap infeksi penyakit. Pemberian imunostimulan yang dilakukan secara terus-menerus dapat mengatur dan mempertahankan sistem imun pada kondisi optimal sampai dengan pemberian berhenti dilakukan (Cerenius *et al.*, 2010; Rowley & Pope, 2014; Jane *et al.*, 2015).

#### Aktivitas Prophenoloxdase (proPO)

Pengamatan pada aktivitas proPO sebelum dan sesudah ujiantang dengan WSSV memperlihatkan bahwa ProPO tertinggi diperoleh pada pemberian vaksin dsRNA VP-24 dengan dosis 0,2 µg (0,042 Abs) dan terendah pada dosis 0,02 µg (0,012 Abs) seperti disajikan pada Gambar 3.

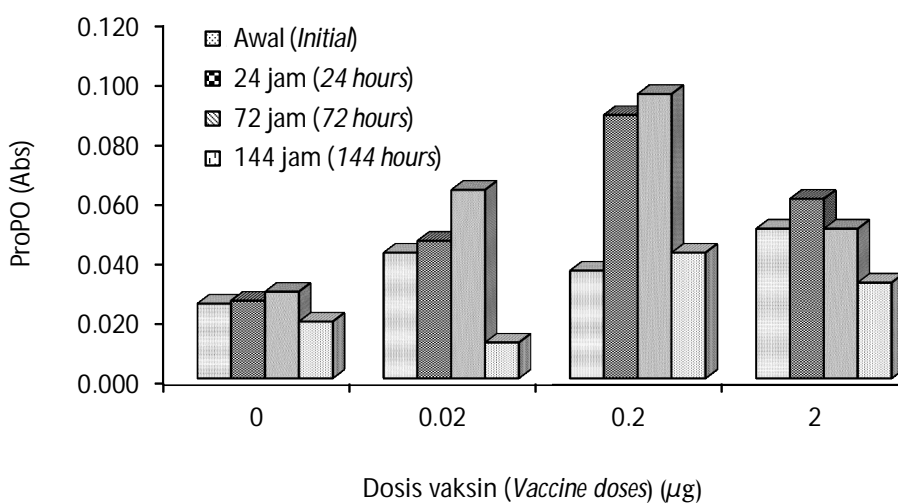


Gambar 2. Jumlah hemosit udang windu pada aplikasi vaksin dsRNA VP-24 dengan dosis berbeda.

Figure 2. Total hemocyte count of black tiger shrimp *P. monodon* tested with dsRNA VP-24 vaccine application with different doses.

Hasil analisis ragam (ANOVA) memperlihatkan bahwa perlakuan dosis vaksin memberikan pengaruh yang nyata pada aktivitas proPO ( $P < 0,05$ ). Aktivitas ProPO meningkat pada 24 jam hingga 72 jam setelah diinjeksi. Paria *et al.* (2013) memperoleh hasil ujiantang WSSV pada pengujian dsRNA VP-28 pada udang windu tidak memberikan perubahan yang signifikan pada ekspresi gen proPO hingga 24 jam, namun terjadi peningkatan ekspresi hingga tiga kali lipat pada 48 jam setelah injeksi.

ProPO merupakan komponen mayor pada sistem imunitas 'innate' pada udang. Sistem kekebalan non-spesifik seluler memiliki dua komponen utama yakni sistem humoral dan seluler, keduanya bekerja secara bersama-sama dan diaktifkan pada saat terjadi tantangan kekebalan. Komponen seluler dimediasi oleh hemosit sedangkan humoral melibatkan komponen yang bebas dari sel hemolymph. Keduanya bersifat interaktif dan saling terkait yang berfungsi secara sinergis untuk melindungi udang dan



Gambar 3. Aktivitas proPO udang windu *P. monodon* dengan aplikasi vaksin pada dosis yang berbeda setelah diuji tantang dengan WSSV.

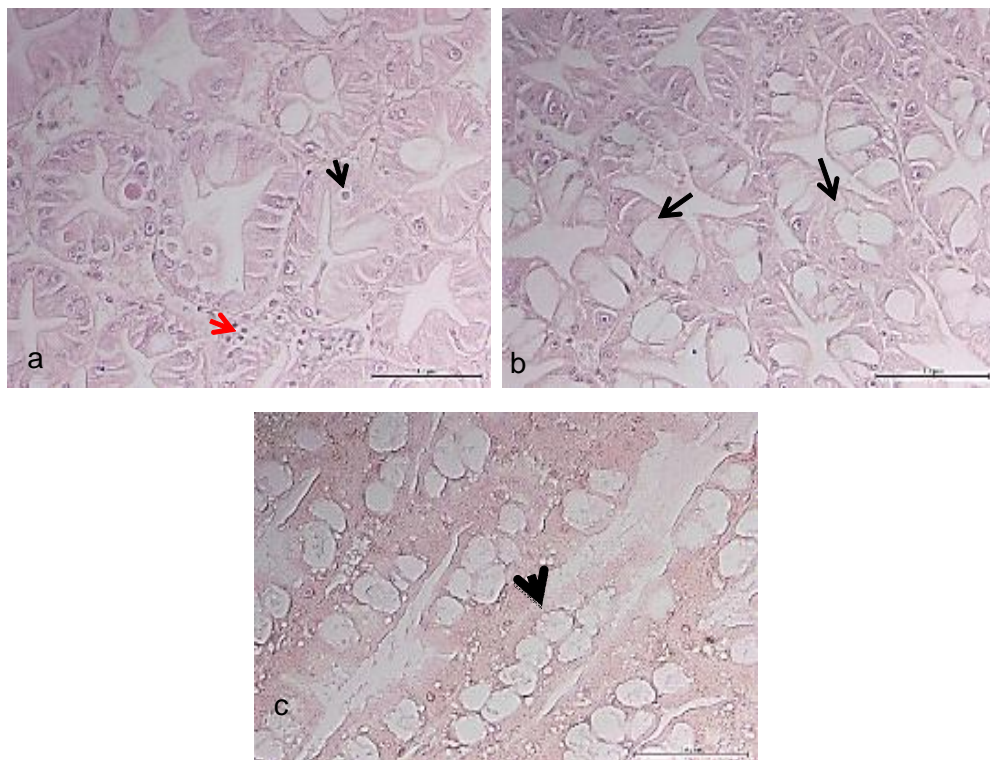
Figure 3. ProPO activity of black tiger shrimp *P. monodon* tested with different doses of vaccine application after WSSV challenge.

menghilangkan partikel asing dan patogen. Di antara berbagai jenis respons kekebalan humoral, salah satu teknik imun invertebrata yang paling efektif melawan partikel asing adalah enkapsulasi melanotik seluler. Melanisasi merupakan komponen pertahanan imun pada krustasea di mana sintesis melanin dilakukan dengan mengaktifkan sistem proPO yang melibatkan enzim PO (Tassanakajon *et al.*, 2013). Rangkaian melanisasi kompleks memerlukan kombinasi peredaran hemositina dan beberapa protein yang terkait dengan sistem pengaktifan prophenoloxidase (proPO). Sistem ini merupakan salah satu unsur humoral yang sering berhasil untuk mengatasi penyakit pada invertebrata. Penurunan aktivitas sistem proPO dapat menyebabkan kegagalan fagositosis dan menyebabkan kerusakan jaringan (Amparyup *et al.*, 2013).

Hasil analisis histopatologi pada hepatopankreas udang yang terserang WSSV memperlihatkan adanya beberapa tingkat kerusakan sel hepatopankreas seperti inklusi badan, nekrotik sel, peningkatan degenerasi lemak, dan lisis sel (Gambar 4). Pada Gambar 4a terlihat adanya hipertropi pada inti sel (*Cowdry type-*

A) tipe inklusi yang merupakan tahap awal infeksi virus WSSV. Tahap tiga infeksi terlihat pada Gambar 4b, di mana inti membran terganggu dan zona pembatas menjadi transparan, dan pada Gambar 4c terlihat sel yang terinfeksi rusak dan mengalami lisis yang merupakan tahap akhir infeksi WSSV.

Menurut Escobedo-Bonilla *et al.* (2008), pada tahap awal terinfeksi virus WSSV, sel menunjukkan inti sedikit hipertrofi. Dalam sitoplasma, retikulum endoplasma (RE) menjadi membesar dengan berlimpah ribosom bebas. Pada tahap-2; dalam inti, material fibril menginduksi pembentukan membran yang segera diisi dengan materi inti virus membentuk ikatan viral. Pada tahap ini, *Cowdry-A* jenis inklusi muncul sebagai zona transparan antara virogenic stroma dan sangat padat elektron berbatas kromatin. Inti menjadi hipertrofi dan bulat. Tahap-3 pada inti; nukleokapsid muncul dengan kerapatan elektron rendah dan secara bertahap tumbuh dari satu ujung ke arah yang lain, masih terbuka. Pusat inklusi intranuklear muncul lebih kecil dari dalam sel dan lebih padat elektron karena kehadiran partikel virus yang berlimpah. Ketika kromatin menghilang, inti membran terganggu, dan



Gambar 4. Profil kerusakan sel hepatopankreas pada udang windu (skala bar= 10  $\mu$ m): (a) badan inklusi (hitam) dan nekrotik sel (merah); (b) peningkatan degenerasi lemak; dan (c) lisis sel dan degenerasi lemak.

Figure 4. Profile of hepatopancreas cells damage on black tiger shrimp *P. monodon* (scale bar= 10  $\mu$ m): (a) inclusion bodies (black arrow) and necrotic cells (red arrow); (b) increased degeneration of fat (black arrows), and (c) cell lysis and fat degeneration (black arrow).

zona pembatas menjadi transparan menyatu dengan sitoplasma. Tahap-4 dalam inti, nukleokapsid menjadi benar-benar tertutup oleh amplop virus. Tahap-5 merupakan tahap akhir morfogenesis virus. Pada tahap akhir ini, sel yang terinfeksi rusak parah dan terganggu, ruang void pada jaringan teramati sebagai sel hancur.

Hingga saat ini persoalan penyakit udang yang disebabkan oleh virus WSSV belum dapat diatasi secara efektif. Pemahaman mengenai interaksi molekuler virus patogen WSSV dengan inang dapat memberikan kontribusi untuk mengatasi persoalan penyakit WSSV pada udang (Verbruggen *et al.*, 2016). Produksi vaksin dsRNA merupakan salah satu upaya untuk mengatasi persoalan WSSV yang didasarkan pada pemahaman interaksi molekuler virus dengan inang. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan implikasi pada peningkatan produksi udang windu *P. monodon* khususnya di Indonesia melalui pencegahan penyakit WSSV.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis vaksin dsRNA VP-24 sebesar 0,2 µg memiliki pengaruh yang signifikan terhadap sintasan (65%), meningkatkan jumlah hemosit ( $1.550 \times 10^4$  sel/mL) dan respons imun udang windu yang diindikasikan dari aktivitas ProPO (0,042 Abs).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiaya oleh APBN Tahun Anggaran 2017 Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Andi Tenriulo, M.Si. yang telah banyak berkontribusi dalam pelaksanaan penelitian, Drh. Wahyuni dalam analisis histopatologi, serta teknisi litkayasa dan nonlitkayasa yang membantu penelitian ini.

## DAFTAR ACUAN

Ahanger, S., Sandaka, S., Ananad, D., Mani, M.K., Kondadhasula, R., Reddy, C.S., Marappan, M., Valappil, R.K., Majumdar, K.C., & Mishra, R.K. (2014). Protection of shrimp *Penaeus monodon* from WSSV infection using antisense constructs. *Mar. Biotechnol.*, 16, 63-73.

Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 990-1001.

Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H., & Söderhäll, I. (2010). Crustacean immunity. In Söderhäll, K. (Ed.), *Invertebrate immunity*. New York, USA: Landes

Bioscience and Springer Science Business Media, LLC, p. 239-258.

Chen, J., Li, Z., & Hew, C.L. (2007). Characterization of a novel envelope protein WSV010 of shrimp white spot syndrome virus and its interaction with a major viral structural protein VP24. *Virology*, 364, 208-213.

Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., & Nauwynck, H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis, and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases*, 31, 1-18.

Haq, MA.B., Vignesh, R., & Srinivasan, M. (2012). Deep insight into white spot syndrome virus vaccines: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, p. 73-77.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317, 1-15.

He, Y., Jua, C., & Zhanga, X. (2015). Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans. *Molecular Immunology*, 68, 399-403.

Huang, P.Y., Leu, J.H., & Chen, L.L. (2014). A newly identified protein complex that mediates white spot syndrome virus infection via chitin-binding protein. *Journal of General Virology*, 95, 1799-1808.

Jane, M.S., Amar, A., & Amar, E.C. (2015). Use of immunostimulans in shrimp culture: An update. *Biotechnological advances in shrimp health management in the Philippines. Research Signpost*, p. 45-71.

Jayachandran, B., Hussain, M., & Asgari, S. (2012). RNA Interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus. *Journal of Virology*, 86(24), 13729-13734.

Jin, B., Sun, T., Yu, X.H., Liu, C.Q., Yang, Y.X., Lu, P., Fu, S.F., Qiu, H.B., & Yeo, A.E.T. (2010). Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. Review Article. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-17.

Krishnan, P., GireshBabu, P., Saravanan, S., Rajendran, K.V., & Chaudhari, A. (2009). DNA constructs expressing long-hairpin RNA (lhRNA) protects *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Vaccine*, 27, 3849-3855.

Kumar, A., Laramore, S., Alexander, P., Allnut, F.C.T., & Sayre, R.T. (2015). Double stranded RNA simultaneously targeting four white spot syndrome virus (WSSV) genes provides protection against WSSV in *Litopenaeus vannamei*. *Int. J. Marine Sci. Ocean Technol.*, 2(2), 5-10.

- Li, F., & Xiang, J. (2013). Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev. Com. Immunol.*, 39, 11-26.
- Lichner, Z., Silhavy, D., & Burgya n, J. (2003). Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *Journal of General Virology*, 84, 975-980.
- Loy, J.D., Mogler, M.A., Loy, D.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.
- Mejía-Ruíz, C.H., Vega-Peña, S., Alvarez-Ruiz, P., & Escobedo-Bonilla, C.M. (2011). Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) VP28 or VP26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, 65-68.
- Paria, A., Greeshma, S.S., Chaudhari, A., Makesh, M., Purushothaman, C.S., & Rajendran, K.V. (2013). Nonspecific effect of double-stranded (ds) RNA on prophenoloxidase (proPO) expression in *Penaeus monodon*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169, 281-289.
- Puneeth, T.G., Akhila, D.S., Dechamma, M.M., Shreeharsha, J.M., Shivakumar, S.K., & Venugopal, M.N. (2017). Comparative efficacy of dsRNA VP24, VP26, RR1 and WSV477 gene against WSSV infection in *Penaeus monodon*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6(2), 665-674.
- 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.
- Rowley, A.F., & Pope, E.C. (2012). Vaccines and crustacean aquaculture: A mechanistic exploration. *Aquaculture*, 334-337, 1-11.
- Sánchez-Paz, A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, 41(43), 34.
- 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.
- Thammasorn, T., Sangsuriya, P., Meemetta, W., Senapin, S., Sarocha Jitrakorn, S., Rattanarojpong, T., & Saksmerprome, V. (2015). Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *BMC Biotechnology*, 15, 110-116.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 954-967.
- Tenriulo, A., Tampangallo, B.R., Parenrengi, A., & Dewi, R.A. (2015). Isolasi dan karakterisasi gen penyandi protein VP-24 WSSV pada udang windu (*Penaeus monodon*) untuk pengembangan teknologi RNAi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, hlm. 593-598.
- 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.
- Verbruggen, B., Bickley, L.K., Aerle, R.V., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Santos, E.M., & Tyler, C.R. (2016). Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, 8(23), 1-29.
- Xie, X., & Yang, F. (2006). White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. *Journal of General Virology*, 87, 1903-1908.
- Yeh, S.P., Chen, Y.N., Hsieh, S.L., Cheng, W., & Liu, C.H. (2009). Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immun.*, 26, 582-588.