

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

## KLONING GEN *PUTATIVE CLEAVAGE PROTEIN 1 (PCP-1)* PADA UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*) YANG TERSERANG *INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS*

Hessy Novita<sup>1)</sup>, Agus Sunarto<sup>2)</sup>, dan Septyan Andriyanto<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar

<sup>2)</sup> CSIRO Health & Biosecurity Flagship, Australian Animal Health Laboratory

### ABSTRAK

Penanggulangan penyakit ikan dapat dilakukan dengan cara meningkatkan kekebalan tubuh ikan melalui program vaksinasi. Namun vaksinasi tidak tepat untuk udang, karena udang tidak mempunyai *immunological memory* seperti ikan. Oleh karena itu, perlindungan udang terhadap serangan penyakit viral dengan menggunakan *RNA interference* (RNAi). Teknologi RNAi digunakan untuk menghalangi (*interfere*) proses replikasi *infectious myonecrosis virus* (IMNV) pada udang vaname dengan cara menon-aktifkan gen *putative cleavage protein 1* (PCP-1), yang berfungsi dalam pembentukan capsid dan proses transkripsi RNA IMNV. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen *putative cleavage protein 1* dalam rangka perakitan teknologi RNAi untuk pengendalian penyakit IMNV pada udang vaname. Tahapan penelitian meliputi koleksi sampel, isolasi RNA, sintesis cDNA, amplifikasi PCR, purifikasi DNA, transformasi, isolasi plasmid, serta sekuensing dan analisis data. Hasil isolasi plasmid cDNA PCP-1 memperlihatkan semua koloni bakteri terseleksi ternyata membawa plasmid hasil insersi DNA gen *PCP-1*, hasil sekuen dengan nilai homologinya mencapai 100% dan 99% yang dibandingkan dengan sekuen di *Genebank*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kloning gen *putative cleavage protein 1* (PCP-1) dari udang vaname yang terserang *Infectious Myonecrosis Virus* berhasil dikloning yang nantinya digunakan untuk perakitan RNAi.

**KATA KUNCI:** *Litopenaeus vannamei*; IMNV; gen *PCP-1*; kloning

**ABSTRACT:** *Putative Cleavage Protein 1 (PCP-1) gene cloning of white shrimp Litopenaeus vannamei infected by infectious myonecrosis virus. By: Hessy Novita, Agus Sunarto, and Septyan Andriyanto*

*The prevention of fish diseases can be done by increasing of the fish immune through vaccination programs. However, the vaccination can not be done for the shrimp, due to the absence of immunological memory. Therefore, the protection of shrimp against viral diseases was done by using of RNA interference (RNAi). RNAi technology is used to interfere infectious myonecrosis virus (IMNV) replication process on white shrimp by disabling of putative cleavage protein 1 (PCP-1) gene, which functions in capsid formation and RNA transcription process. The study was conducted to perform putative cleavage protein 1 gene cloning in the framework of RNAi technologies for IMNV disease control in white shrimp. This study consisted of sample collection, RNA isolation, cDNA synthesis, PCR amplification, DNA purification, transformation, plasmid isolation, sequencing and data analysis. The cDNA PCP-1 plasmid isolation showed that all selected bacterial colonies appeared lead insertion plasmid DNA PCP-1 gene with 100% and 99% sequence homology compared to sequence in Genebank. The results exhibited that the putative cleavage protein 1 (PCP-1) gene cloning from infected white shrimp of IMNV was completed successfully and used for the framework of RNAi.*

**KEYWORDS:** *Litopenaeus vannamei*; IMNV; *PCP-1* gene; cloning

### PENDAHULUAN

Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) berusaha untuk meningkatkan produksi perikanan

budidaya melalui industrialisasi. Salah satu program andalannya adalah revitalisasi tambak udang. Namun demikian, banyak kendala yang dihadapi dalam program ini, antara lain serangan penyakit, terutama penyakit viral yang menyebabkan kematian massal pada udang, penurunan produksi, dan kerugian ekonomi. Penyakit *infectious myonecrosis virus* (IMNV) dapat menyebabkan kematian antara 40%-70% (Lightner

# Korespondensi: Instalasi Penelitian dan Pengembangan Pengendalian Penyakit Ikan, Depok-Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar. Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154. Tel.: + (0251) 8313200  
E-mail: [hesta\\_biotech@yahoo.com](mailto:hesta_biotech@yahoo.com)

et al., 2004; Senapin et al., 2007; OIE, 2013), menyebabkan penurunan produksi udang vaname dari 208.648 ton pada tahun 2008 menjadi 170.699 ton di tahun 2009, dan terus menurun menjadi 157.525 ton pada tahun 2010, sehingga target produksi udang vaname sebesar 275.000 ton pada tahun 2010 tidak tercapai. Serangan penyakit IMNV diperkirakan telah menyebabkan kerugian sebesar 0,2-1 miliar US\$ (Sunarto, 2011).

Berbagai usaha penanggulangan penyakit udang dan ikan telah lama dilakukan, antara lain melalui penggunaan obat dan antibiotika. Tetapi penggunaan obat dan antibiotika untuk penanggulangan penyakit pada udang dan ikan menimbulkan masalah resistensi bakteri dan residu antibiotika pada udang dan ikan. Banyak produk perikanan asal Indonesia yang ditolak oleh negara pengimpor karena mengandung residu antibiotika dan logam berat. Untuk menghindari persoalan tersebut maka diterbitkan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. 26/2002 tentang penggunaan obat ikan dan larangan penggunaan antibiotika tertentu.

Salah satu alternatif penanggulangan penyakit udang dan ikan yang ramah lingkungan adalah peningkatan sistem kekebalan tubuh (*immunity*) ikan melalui program vaksinasi sehingga ikan lebih tahan terhadap serangan penyakit tertentu. Vaksinasi pada ikan dilakukan untuk merangsang sistem kekebalan humoral (sel limfosit B) agar memproduksi antibodi yang memberikan perlindungan ikan terhadap penyakit tertentu. Strategi vaksinasi seperti pada ikan ini tidak dapat diterapkan pada udang, karena udang (dan hewan invertebrata lain) mempunyai sistem kekebalan tubuh yang sangat primitif yang berbeda dengan sistem kekebalan tubuh ikan.

Udang tidak mempunyai *immunological memory*, seperti sel limfosit B pada ikan dan mamalia, sehingga sistem kekebalan tubuh udang tidak dapat dirangsang dengan pemberian vaksin konvensional seperti pada ikan (Warr, 1997). Oleh karena itu, usaha perlindungan udang terhadap serangan penyakit dilakukan dengan menggunakan teknologi *RNA interference* (RNAi) (Bernstein et al., 2001; Sarathi et al., 2008; Saksmerprome et al., 2009; Flegel, 2009). RNAi adalah teknologi untuk mengganggu (*interfere*) proses replikasi virus ditingkat RNA (Wiznerowicz et al., 2006). Pada virus udang, penon-aktifan gen (*gene silencing*) dilakukan dengan cara mengganggu fungsi gen yang vital untuk proses replikasi virus, misalnya gen viral protein 28 (VP28) pada *white spot syndrome virus* (WSSV) (Sarathi et al., 2008), gen RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) pada *yellow head virus* (YHV) (Saksmerprome et al., 2009), dan gen *putative cleavage*

*protein 1* (PCP-1) pada IMNV (Loy et al., 2012). Gen PCP-1 adalah gen yang berfungsi dalam pembentukan capsid dan proses transkripsi RNA IMNV. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen *putative cleavage protein 1* yang digunakan dalam rangka perakitan teknologi RNAi untuk pengendalian penyakit IMNV pada udang vaname.

## BAHAN DAN METODE

### Koleksi Sampel Udang Vaname

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah hemolim udang vaname yang terinfeksi IMNV. Gejala penyakit IMNV yang paling sering terlihat adalah kerusakan (nekrosa) berwarna putih keruh pada otot/daging, terutama pada otot perut bagian atas (punggung) dan ekor yang tampak berwarna putih *opaque* sampai kemerahan (Senapin et al., 2007). Sampel udang diperoleh dari lokasi pertambakan udang di daerah Kalianda, Lampung.

### Isolasi RNA Total

RNA total diekstraksi dari jaringan udang yang terinfeksi IMNV dengan *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen catalog kit /ID 74104). RNA yang telah diekstraksi ini digunakan sebagai *template* dalam reaksi RT-PCR.

### Sintesis cDNA dan Amplifikasi PCR

RNA hasil ekstraksi selanjutnya ditranskripsi balik menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan Oligo dT3 dengan menggunakan teknik *Reverse Transcription* (RT). RNA udang vaname sebanyak 5  $\mu$ L, ditambah H<sub>2</sub>O sebanyak 25  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Kemudian dipindahkan ke dalam es selama dua menit. Selanjutnya dipindahkan semua larutan (mix. RNA + H<sub>2</sub>O) ke tabung *first strand reaction mix bead* (RTG your prime First Beads). Selanjutnya ditambahkan primer Oligo DT 3 (5'-gta ata cga ata act ata ggg cag gcg tgg tgc acg gcc cgg gct ggt ttt ttt ttt ttt ttt t-3', konsentrasi 1  $\mu$ g /3  $\mu$ L) sebanyak 3  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam, lalu ditambahkan 50  $\mu$ L *RNAse free water*. Sebelum dilakukan amplifikasi dengan PCR dilakukan penghitungan konsentrasi dan kemurnian cDNA sampel dengan nanodrop.

Selanjutnya cDNA diamplifikasi dengan PCR dengan volume 100  $\mu$ L; Master Mix Flexi 20  $\mu$ L, MgCl 25 mM 10  $\mu$ L, dNTP 10 mM 2  $\mu$ L, *Platinum Taq Polymerase* 1  $\mu$ L, primer *Reverse*, dan *Forward* (10 pmol/ $\mu$ L) masing-masing 2  $\mu$ L, Cdna 2  $\mu$ L dan 51  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Primer Oligonukleotida yang digunakan untuk sintesis cDNA (gen *PCP-1*) didesain dari (*GenBank accession no.*

EF061744) yaitu IMNV95F: 5'-AGAAAGTTTGTTCGTAGAGCGAGA-3' dan IMNV474R: 5'-AAAGGTGGCAGGTGCCATACTGA-3' (Senapin *et al.*, 2007). Proses PCR dengan pradenaturasi pada suhu 95°C selama empat menit, dilanjutkan 35 siklus dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama satu menit, dan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit (Loy *et al.*, 2012).

#### Isolasi Fragmen DNA dari Gel dan Purifikasi Produk PCR

Purifikasi DNA dari gel menggunakan QIAquick PCR, purification kit (QIAGEN catalog kit /ID 28104) mengikuti instruksi dari manual. Selanjutnya hasil purifikasi dikonfirmasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5%.

#### Transformasi, Seleksi, dan Perbanyakan Koloni Bakteri Terinsersi Gen PCP1

Hasil purifikasi cDNA dari produk PCR kemudian digunakan dalam proses transformasi ke dalam bakteri kompeten *Escherichia coli* TOP 10 yang diinsersi ke plasmid p®2.1 sebagai vektor terlebih dahulu. Reaksi kloning menggunakan TOPO® TA Cloning® Kit For Subcloning With TOP10 *E. coli* (*invitrogen*) sesuai dengan instruksi manual (Cat No K2000-01). Hasil kloning dicampur ke dalam tabung mikro berisi sel kompeten *Escherichia coli* TOP 10. Transformasi dilakukan dengan cara kejutan panas suhu 42°C selama 30 detik. Setelah diinkubasi *on-ice* selama 2–3 menit, ke dalam tabung mikro ditambahkan 250 µL larutan SOC (1,2 g polypeptone; 0,3 g yeast extract; 0,035 g NaCl; 0,011 g KCl; 600 µL MgCl<sub>2</sub> 1M; 600 µL MgSO<sub>4</sub> 1M dan 60 µL glucose 2M dalam 60 mL SDW). Selanjutnya tabung mikro berisi bakteri hasil transformasi diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam. Kemudian bakteri disebar di atas cawan *Luria agar* yang mengandung X-gal dan ampisilin, dan inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama semalam. Koloni putih yang tumbuh di media *Luria agar* + ampisilin + X-Gal diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi 4 mL LB *broth* + ampisilin. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan *shaker*, dilanjutkan dengan isolasi plasmid.

#### Verifikasi Hasil Isolasi Plasmid dengan PCR

Isolasi plasmid dari koloni putih dilakukan menggunakan kit *GeneAid High Speed Plasmid Mini Kit* dengan prosedur sesuai dengan manual (Cat. NoPDL100). Plasmid yang telah diisolasi, kemudian di PCR dengan primer IMNV95F: 5'-AGAAAGTTTGTTCGTAGAGCGAGA-3' dan

IMNV474R: 5'-AAAGGTGGCAGGTGCCATACTGA-3' (Senapin *et al.*, 2007). Proses PCR dilakukan dengan pradenaturasi pada suhu 95°C selama empat menit, dilanjutkan 35 siklus dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama satu menit, dan *final extention* pada suhu 72°C selama 10 menit (Loy *et al.*, 2012).

#### Sekuensing dan Analisis Data

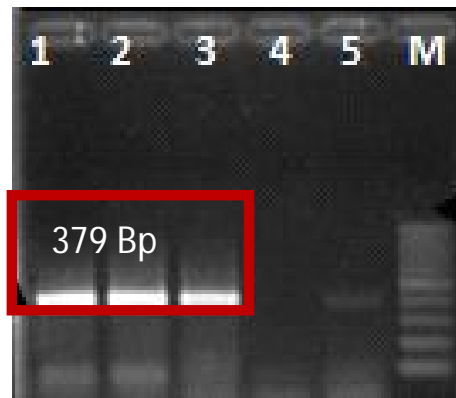
Plasmid yang telah diisolasi dan di PCR kemudian disekuensing dengan menggunakan mesin pengurut DNA otomatis (*Automated DNA Sequencer* ABI Prism 310, Perkin-Elmer). Analisis Data untuk sekuens Nukleotida dibandingkan dengan database di Bank Gen dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) yang disediakan NCBI (*National Center for Biotechnology information*) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Alignment dan persentase kesamaan dianalisis menggunakan program MEGA 5.

#### HASIL DAN BAHASAN

##### Isolasi RNA Total dan Sintesis cDNA

RNA total dari organ target udang vaname yang terinfeksi IMNV telah berhasil diekstraksi dan disintesis menjadi cDNA dengan panjang fragmen target DNA 379 bp setelah dikonfirmasi dengan PCR. Hasil amplifikasi PCR dan dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5% ditunjukkan pada Gambar 1. Pita cDNA dengan panjang sekitar 379 bp yang diberi tanda panah pada gambar merupakan kandidat fragmen gen *PCP-1*.

Teramplifikasinya cDNA dengan primer IMNV95F dan IMNV474R dengan ukuran 379 bp menunjukkan bahwa sintesis cDNA total melalui proses transkripsi balik telah menghasilkan pita tunggal. Sampel DNA dikatakan spesifik dan berhasil diamplifikasi apabila hasil analisis elektroforesis menunjukkan terdapatnya pita tunggal DNA dengan ukuran sesuai berdasarkan penanda yang telah diketahui sebelumnya (Settanni *et al.*, 2006). cDNA yang diuji kemurnian dan konsentrasinya hasilnya dipaparkan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil pengukuran dengan *nanodrop* pada masing-masing sampel, cDNA yang berhasil diisolasi memiliki kemurnian yang relatif tinggi, dilihat dari nisbah A260/280 yang mempunyai nilai terendah 1,88 dan kemurnian tertinggi 1,95. Adapun perolehan cDNA tertinggi adalah sampel K1 yaitu 700 ng/µL. DNA dikatakan murni jika rasio OD260/OD280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0. Kemurnian DNA memengaruhi hasil PCR di mana jika pada ekstrak DNA banyak kontaminannya, maka akan mengganggu proses PCR (Sambrook & Russel, 2001).



Gambar 1. Hasil amplifikasi cDNA udang vaname *Litopenaeus vannamei* menggunakan primer IMNV95F dan IMNV474R, no. 1-3 cDNA, 4 (kontrol negatif), dan M (Marker)

Figure 1. Results of cDNA amplification of white shrimp *Litopenaeus vannamei* using IMNV 95F and IMNV 474R primer, no. 1-3 cDNA, 4 (negative control), and M (Marker)

Tabel 1. Hasil penghitungan uji kemurnian dan konsentrasi cDNA  
Table 1. The testing results of the purity and concentration of cDNA

Sampel Sample	Kemurnian A (260/280) Purity A (260/280)	Konsentrasi cDNA Concentration cDNA (ng/ $\mu$ L)
K-1	1.95	700
K-2	1.89	623.23
K-3	1.88	677.35

### Transformasi pada Bakteri *E. coli* TOP 10

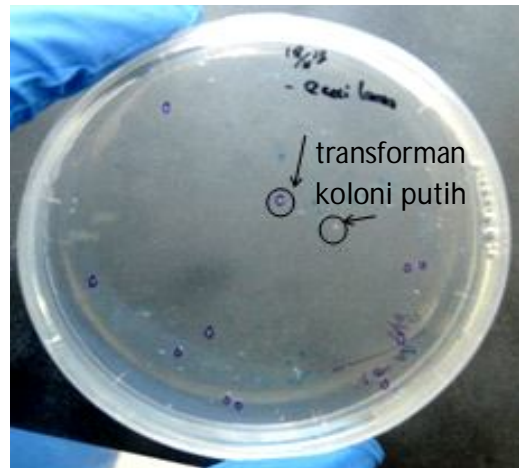
cDNA udang vaname yang telah diamplifikasi dengan PCR dengan target 379 bp dan telah dipurifikasi, selanjutnya kemudian diklon ke dalam *TOPO TA Cloning*. Hasil pengklonan tersebut kemudian dimasukkan melalui proses transformasi ke dalam bakteri *E. coli* TOP 10. Keberhasilan transformasi dievaluasi menggunakan metode seleksi koloni biru putih. Proses transformasi telah berhasil dilakukan yang ditunjukkan dengan tumbuhnya transforman koloni putih bakteri *E. coli* TOP 10 pada media-media seleksi yang mengandung antibiotik ampicilin + X-gal. Hasil seleksi koloni biru-putih pada koloni *E. coli* TOP 10 yang berwarna putih ditunjukkan pada Gambar 2.

Koloni putih yang tumbuh pada media seleksi merupakan *E. coli* TOP 10 yang mengandung insersi atau yang membawa gen target PCP-1, sedangkan koloni yang berwarna biru merupakan *E. coli* yang tidak mengandung insersi (Gambar 2). Gen lacZ

menyandikan ( $\beta$ -galaktosidase) yang mengubah substrat X-gal menjadi berwarna biru. Ketika cDNA PCP-1 menyisip pada gen LacZ, maka gen LacZ tidak dapat diekspresikan sehingga koloni *E. coli* berwarna putih. Bila tidak ada fragmen yang menyisip pada LacZ maka gen X-gal diekspresikan sehingga koloni yang terbentuk berwarna biru.

### Verifikasi Hasil Isolasi Plasmid dengan PCR

Isolasi plasmid telah dilakukan dengan menggunakan kit *Gene Aid High Speed Plasmid Mini Kit* dan hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 3. Seleksi melalui Verifikasi PCR koloni untuk memastikan adanya sisipan gen PCP-1 pada plasmid rekombinan yang juga menunjukkan proses transformasi ini telah berhasil dilakukan. PCR koloni menggunakan primer IMNV95F dan IMNV474R, dengan hasil fragmen DNA berukuran 379 bp. Hal ini menunjukkan bahwa semua koloni bakteri yang berwarna putih dalam *master plate* membawa plasmid dengan insersi DNA gen PCP-1. Hasil amplifikasi plas-



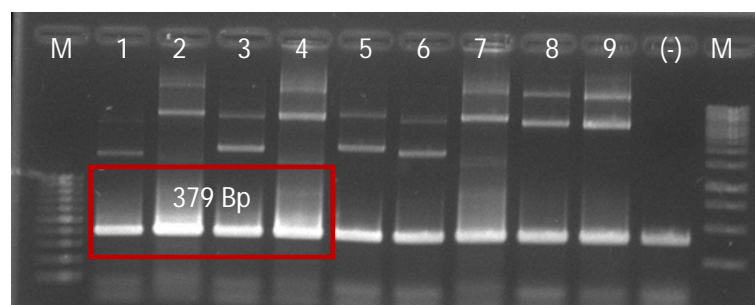
Gambar 2. Koloni *E. coli* TOP 10 yang terbentuk setelah ditransformasikan pada *TOPO TA Cloning*

Figure 2. *E. coli* TOP 10 colonies formed after transformed on *TOPO TA Cloning*

mid rekombinan yang memberikan hasil positif pada tahap verifikasi dengan PCR menunjukkan terbentuknya pita DNA yang spesifik dengan ukuran 379 bp. Hasil verifikasi kandidat rekombinan melalui PCR menunjukkan bahwa gen *PCP-1* tersisip dalam plasmid *p@2.1*.

Hasil penelitian Loy *et al.* (2012) menyatakan bahwa dengan desain primer IMNV95F dan IMNV474R untuk perakitan RNAi dsRNA95-475, yang mengakit protein pada ujung 5' dari genom IMNV yaitu gen *PCP-1* memberikan perlindungan yang lebih tinggi terhadap penyakit IMNV dalam dosis dan durasi pemberian dsRNA jika dibandingkan dengan dsRNA 3764-4805

yang menargetkan daerah *major capsid protein* (MCP), yang hanya memberikan perlindungan *intermediate*, ketika dsRNA diberikan 48 jam setelah diuji tantang dengan virus IMNV. Daerah dsRNA 95-475 ini meliputi Protein-1 dengan bagian terminal Protein-2 yang berfungsi dalam menekan kekebalan tubuh inang. Protein-1 terdapat gen yang terlibat dalam proses patogenesis virus pada inang, juga faktor yang diperlukan untuk replikasi virus, atau protein yang mengubah respons inang terhadap antivirus RNAi. Sehingga dapat digunakan sebagai bagian yang ditargetkan untuk perakitan RNAi yang dapat menghambat RNA dalam replikasi genom virus.



Gambar 3. Hasil amplifikasi cDNA plasmid hasil isolasi dari klon IMNV menggunakan *GeneAid High Speed Plasmid Mini Kit*. No. 1-9 plasmid yang membawa insert. M: Marker

Figure 3. Amplification results of cDNA plasmids isolated from IMNV clones by using *GeneAid High Speed Plasmid Mini Kit*. No. 1-9 plasmid with insert. M: Marker

### Analisis Hasil Sekuen dari Purifikasi Plasmid

Hasil sekuensing menunjukkan kesejajaran (*alignment*) nukleotida dengan program BLAST antara hasil sekuen dari produk plasmid dengan sekuen yang ada di *Genebank*. Fragmen gen *PCP-1* dalam penelitian ini memiliki nilai identitas yang mencapai 100% dan 99% dengan sekuen yang ada di *Genebank* dalam spesies yang sama. Nilai homologi sampel K1 (100%) yang identik dengan sekuen IMNV dari Brazil, K2 (99%), dan K3 (99%) identik dengan sekuen dari *Genebank* yang berasal dari sekuen IMNV Indonesia sebagaimana disajikan pada Tabel 2. Konfirmasi identitas sekuen DNA dilakukan melalui sekuensing fragmen gen *PCP-1* dan penjarannya dengan sekuen gen yang terdapat pada *Genebank*. Hal tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa gen yang teramplifikasi merupakan fragmen gen target sesuai yang diharapkan.

Sekuensing yang dilakukan dua arah menghasilkan sekuen DNA yang berukuran 379 bp. Analisis melalui BLASTn menunjukkan bahwa gen yang tersisip dalam plasmid *p®2.1* merupakan fragmen gen *PCP-1*. Persentase tingkat homologi sekuen nukleotida ditunjukkan dengan kemiripan hasil penjaran sekuen yang terlihat dari nilai identitas. Tingkat homologi juga dapat diketahui dari nilai *Expect value (E-value)* yang terdapat pada *hitlist* BLASTn. Nilai *E-value* 0 (nol) pada hasil analisis menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut memiliki homologi yang tinggi. Menurut Claverie & Notredame (2007), *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Semakin tinggi nilai *E-value* maka semakin rendah homologi antara kedua sekuen, sebaliknya semakin rendah nilai *E-value* maka semakin tinggi homologi antara kedua sekuen. Secara

teoritis kisaran skor dengan *E-value*  $>e^{-04}$  pada analisis BLAST menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi (Claverie & Notredame, 2007).

Peranan suatu gen dalam pengendalian suatu penyakit pada ikan dapat dipelajari melalui pendekatan dua arah, yaitu meningkatkan ekspresi gen dengan mengkonstruksi vektor *over expression*, serta menghentikan atau menurunkan ekspresi gen antara lain dengan mengkonstruksi RNAi (*RNA interference*). Teknik RNAi merupakan salah satu cara yang efektif untuk menguji fungsi biologi mRNA target pada ikan. Perkembangan terkini mengenai vektor RNAi yang menggunakan promotor konstitutif dan teknik pengklonan secara Gateway® memudahkan untuk mengkonstruksi vektor RNAi yang mempunyai sekuen pemicu dsRNA dan memudahkan pula untuk menganalisis fungsi gen target. RNAi dapat menyebabkan mRNA terdegradasi sehingga gen menjadi tidak berfungsi. Dengan mengkonstruksi RNAi dari gen *PCP-1* diharapkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan untuk mempelajari dan mengaplikasikan kandidat antivirus RNAi dalam pengendalian penyakit IMNV.

### KESIMPULAN

Gen *putative cleavage protein 1 (PCP-1)* dari udang vaname yang terserang *Infectious Myonecrosis Virus* berhasil dikloning, berdasarkan hasil isolasi plasmid cDNA *PCP-1* yang menunjukkan semua koloni bakteri terseleksi membawa plasmid hasil insersi DNA gen *PCP-1*. Analisis kesejajaran urutan nukleotida menunjukkan bahwa cDNA dari gen *PCP-1* nilai homologinya mencapai 100% dan 99% dengan sekuen di *Genebank* yaitu identik dengan sekuen dari Brazil dan Indonesia.

Tabel 2. Hasil analisis sekuen dengan BLASTn

Table 2. Sequence analysis by BLASTn

Isolat <i>Isolate</i>	Homologi <i>Homology</i>	Kemiripan <i>Identity (%)</i>	<i>E-value</i>	Nomor akses <i>Accession number</i>
K-1	<i>Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Brazil complete</i>	100	0.0	KJ556923.1
K-2	<i>Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome</i>	99	5.00E-174	KF836757.1
K-3	<i>Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strain Indonesia, complete genome</i>	99	5.00E-174	KF836757.1

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami kepada Johan Afandi yang membantu pelaksanaan penelitian. Penelitian ini merupakan kegiatan yang didanai oleh DIPA-APBN Tahun 2013.

## DAFTAR ACUAN

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363–366.
- Claverie, J.-M., & Notredame, C. (2007). *Bioinformatics for Dummies*. 2nd edition. Wiley Publishing, Inc. Indiana, 417 pp.
- Flegel, T.W. (2009). Hypothesis for heritable, anti-viral immunity in crustaceans and insects. *Biology Direct*, 4, 32.
- Lightner, D.V., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Tang, K.T.F., Redman, R.M., Pasos de Andrade, T., & Bonami, J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Glob. Aquac. Advocate*, 7, 85.
- 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 *Litopenaues vannamei*. *Journal of General Virology*, 93, 880-888.
- OIE. (2013). Infectious myonecrosis virus. [www.oit.int](http://www.oit.int).
- Saksmerprom, V., Charoonnart, P., Gangnonngiw, W., & Withyachumnarkul, B. (2009). A novel inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. *Journal of Virological Methods*, 162, 213-217.
- Sambrook, J., & Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN:0-87969-576-3, 1885 pp.
- Sarathi, M., Martin, C., Simon, C., Venkatesan, A.S., & Hameed, S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to Protect *Penaeus monodon* from *White Spot Syndrome Virus*. *Marine Biotechnology*, 10, 242–249.
- Senapin, S., Phewsaiya, K., Briggs, M., & Flegel, T.W. (2007). Outbreaks of myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, 266, 32-38.
- Settanni, L., Valmori, S., Sinderen, D.W., Suzzi, G., Paparella, A., & Corsetti, A. (2006). Combination of multiplex PCR and PCR denturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3793-3796.
- Sunarto, A. (2011). Current status of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Paper presented at One Day Workshop on Prevention and Control of IMNV in Indonesia*. Keynote speaker Prof. Donald V. Lightner, University of Arizona and OIE Reference Laboratory for IMNV. Jakarta, 14 July 2011. 6 pp.
- Warr, G.W. (1997). The adaptive immune system of fish. In *fish vaccinology*, edited by Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., & Bown, F. Development of Biological Standard, 90, 15-21.
- Warren, A.A., Meola, D.M., Wang, Y., Guo, X., Zhou, L., Xiang, J., Moss, S., Arce, S., Warren, W., Xu, Z., & Bell, K. (2006). Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC) repeats of the Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescence in situ hybridization. *Mar. Biotechnol.*, 8, 467–480.
- Wiznerowicz, M., Jolanta, S., & Trono, D. (2006). Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nature Methods*, 3, 682-688.