

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

## TEKNIK PENYIAPAN VAKSIN *DOUBLE-STRANDED RNA* (dsRNA) VP 15 DENGAN METODE PEMANASAN BAKTERI

Mujayana, Nurjanna, dan Muhammad Syakariah

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau dan Penyuluhan Perikanan

Jl. Makmur Dg. Sitakka No.129, Maros 90512, Sulawesi Selatan

E-mail: [mujayana@kkp.go.id](mailto:mujayana@kkp.go.id)

### ABSTRAK

*Double-stranded RNA* (dsRNA) merupakan suatu produk dari teknologi *RNA interference* (RNAi) untuk meningkatkan resistensi udang windu. Sebelum vaksin dsRNA diaplikasikan pada udang windu, perlu dilakukan persiapan vaksin dsRNA. Penyediaan bahan vaksin dsRNA dilakukan dengan metode pemanasan bakteri pada suhu 80°C. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu pemanasan yang mampu mematikan bakteri tanpa merusak konstruksi gen VP-WSSV yang merupakan bahan vaksin dsRNA. Percobaan ini dirancang menggunakan waktu pemanasan yang berbeda, yaitu: 5, 10, 15 menit, dan sebagai kontrol digunakan kultur bakteri tanpa pemanasan. Verifikasi dilakukan dengan penumbuhan kembali bakteri setelah pemanasan pada media Luria Bertani (LB). Selain verifikasi melalui penumbuhan kembali bakteri, analisis juga dilakukan melalui isolasi plasmid DNA dan deteksi gen VP-15 dengan teknik PCR. Hasil kegiatan menunjukkan pemanasan pada suhu 80°C selama 5-15 menit mampu mematikan bakteri tanpa merusak plasmid DNA dari VP-15.

**KATA KUNCI:** vaksin dsRNA; pemanasan; verifikasi bakteri; plasmid

### PENDAHULUAN

*Double-stranded RNA* (dsRNA) merupakan suatu produk dari teknologi *RNA interference* (RNAi) untuk meningkatkan resistensi udang windu. Produksi vaksin dsRNA VP-WSSV dilakukan dengan cara kloning gen target ke dalam vektor RNAi dan selanjutnya ditransformasikan ke bakteri kompeten sel sehingga konstruksi gen dapat dilakukan di plasmid bakteri rekombinan (Parenrengi *et al.*, 2018). Willey *et al.* dalam Yusuf *et al.* (2014) mendefinisikan plasmid sebagai molekul DNA *double-stranded* berbentuk sirkuler atau linear yang dapat bereplikasi secara *independent*. Plasmid bioteknologi sering digunakan sebagai alat untuk memasukkan gen asing ke dalam sel bakteri untuk memproduksi protein rekombinan. Sistem ekspresi gen rekombinan menggunakan plasmid bakteri telah digunakan secara luas untuk memproduksi untuk memproduksi berbagai tipe protein seperti protein terapi dan vaksin DNA. Bakteri yang sering digunakan dalam teknologi produksi DNA rekombinan adalah *Escherichia coli* karena karakteristiknya sudah banyak diketahui. Kegiatan riset yang telah dilakukan di kelompok peneliti Bioteknologi BRPBPAP, mengenai viral protein (VP) dari WSSV difokuskan pada VP-15 dan VP-24. Kedua gen ini merupakan protein struktural utama dari WSSV yang berperan penting dalam proses infeksi WSSV pada

udang (van-Hulten *et al.*, 2002). Sebagai langkah awal pembuatan vaksin dsRNA telah dilakukan isolasi dan karakterisasi gen pengkode VP-24 (Tenriulo *et al.*, 2016) dan VP-15 (Parenrengi *et al.*, 2017). Pada makalah ini vaksin yang disajikan adalah vaksin dsRNA terkonstruksi gen VP-15.

Sebelum diaplikasikan pada udang windu, vaksin dsRNA perlu dipersiapkan terlebih dahulu. Persiapan vaksin dsRNA VP-WSSV dilakukan dengan cara mematikan bakteri rekombinan dengan sistem pemanasan (*heat-killed bacteria*) dengan merendam pada suhu 80°C selama lima menit kemudian disimpan pada suhu -20°C (Aonullah *et al.*, 2016) sampai vaksin tersebut diaplikasikan. Untuk meyakinkan bahwa bakteri telah mati tetapi konstruksi gen VP-WSSV tidak rusak maka dilakukan verifikasi penumbuhan kembali bakteri setelah dipanaskan selama 5, 10, dan 15 menit, serta kontrol (tanpa pemanasan). Selain verifikasi melalui penumbuhan kembali bakteri, analisis juga dilakukan melalui isolasi plasmid DNA dan deteksi gen VP-15 dengan teknik PCR. Tujuan kegiatan ini untuk mengonfirmasi waktu pemanasan yang tepat agar diperoleh vaksin dsRNA VP-15 yang tidak rusak karena efek lama pemanasan dan tidak mengandung bakteri dari plasmid. Sehingga pada saat diaplikasikan pada udang windu dapat berfungsi secara efektif.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah bakteri rekombinan *Escherichia coli*, media Luria Bertani (LB) cair, antibiotik ampisilin, media selektif padat, presto mini plasmid kit, *ready to go PCR beads*, primer VP 15 sal 1 F, primer VP 15 kpn R, *marker 100 bp plus, aqua miliq*, agarose, larutan Tris Borat EDTA (TBE) 1x, *loading dye, gel red*, dan alkohol 70%.

### Alat

Alat yang digunakan adalah *water bath, micro sentrifuge*, mesin *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, perangkat DNA elektroforesis, dokumentasi gel, neraca analitik, *micro pipet*, erlenmeyer 100 mL, tabung *corning*, spatula, parafilm, tabung mikro, dan pipet tip.

### Metode

#### Kultur bakteri dan persiapan vaksin dsRNA

Persiapan vaksin dsRNA diawali dengan kultur bakteri rekombinan. Disediakan tiga erlenmeyer yang diisi masing-masing 100 mL media LB yang mengandung ampisilin 100 mg/L, kemudian ditambahkan masing-masing satu koloni bakteri rekombinan dan diinkubasi pada *water bath* dengan kecepatan 250 rpm pada suhu 37°C selama semalam (sekitar 16-18 jam). Bakteri yang telah tumbuh diambil menggunakan ose secara aseptik kemudian digores pada media padat sebagai kontrol tanpa pemanasan (T-0). Selanjutnya bakteri tersebut dimatikan dengan pemanasan pada suhu 80°C dengan cara direndam dalam *water bath* selama lima menit (T-5), 10 menit (T-10), dan 15 menit (T-15). Proses kultur bakteri dan persiapan vaksin dsRNA terlihat pada Gambar 1.

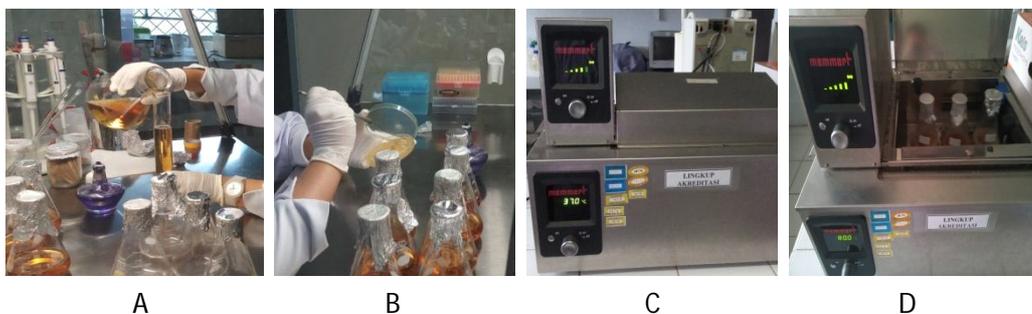
#### Verifikasi bakteri dan plasmid

Verifikasi bakteri dilakukan dengan cara bakteri yang telah dimatikan pada waktu pemanasan T-5,

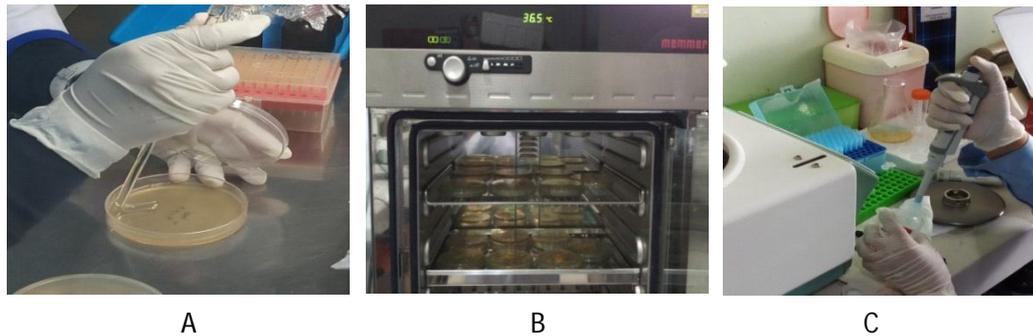
T-10, dan T-15 masing-masing diambil 100 µL kemudian ditumbuhkan pada media padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Setelah 16 jam pertumbuhan bakteri diamati. Selanjutnya dilakukan verifikasi plasmid melalui isolasi DNA plasmid menggunakan presto mini plasmid kit dengan proses kerja yang telah ditetapkan yaitu: sebanyak 1,5 mL kultur bakteri dipindahkan ke tabung mikro kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm. *Supernatant* dibuang dan pelet ditambahkan 200 µL larutan buffer PD-1. Pelet dilarutkan kembali dengan cara pipetting dan ditambahkan 200 µL larutan PD-2 selanjutnya dibolak balik sampai homogen sebanyak 10 kali dan didiamkan selama 2-5 menit. Larutan ditambahkan 300 µL larutan PD-3, disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama tiga menit. Larutan dipindahkan ke kolom PDH dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik, kemudian *supernatant* dibuang. Ke dalam kolom PDH ditambahkan 400 µL larutan W1, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. *Supernatant* dibuang dan ditambahkan 600 µL *wash buffer*, disentrifugasi kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. *Supernatant* dibuang dan kolom disentrifugasi kering selama tiga menit. Kolom dipindahkan pada *tube* 1,5 mL; ditambahkan 50 mL elution buffer, didiamkan selama dua menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama dua menit. Adapun proses verifikasi bakteri dan pasmid terlihat pada Gambar 2.

#### Deteksi gen VP 15 dengan teknik PCR

DNA plasmid yang telah diisolasi digunakan sebagai *template* DNA. Ke dalam RTG PCR *Beads* ditambahkan sebanyak 1 µL DNA plasmid, 1 µL primer VP 15 sal 1 F, 1 µL VP 15 kpn R dan ditambahkan 22 µL akuabides steril. Selanjutnya sampel diamplifikasi pada predenaturasi 94°C selama lima menit, (denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 65°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 30 detik) sebanyak 35 siklus, ekstensi akhir 72°C selama tujuh menit. Kemudian hasil PCR dielektroforesis.



Gambar 1. Preparasi media kultur bakteri (A), memindahkan koloni dari media padat ke media cair (B), bakteri dikultur pada suhu 37°C menggunakan *water bath* (C), bakteri dimatikan pada suhu 80°C (D).



Gambar 2. Kultur bakteri T-0, T-5, T-10, dan T-15 pada media padat dengan metode sebar (A), inkubasi bakteri pada suhu 37°C menggunakan incubator (B), isolasi plasmid dengan plasmid kit (C).

### Elektroforesis

Agarose ditimbang sebanyak 0,2 g (agar 1,0%) dan dilarutkan dengan 20 mL TBE 1x. Selanjutnya dipanaskan dalam *microwave* sampai mendidih dan jernih. Kemudian ditambahkan *gel red* sebanyak 1  $\mu$ L lalu dituang pada *mini-gel electrophoresis system* dan ditunggu sampai padat kurang lebih 20 menit. Setelah agar jadi, sisir pencetak diangkat dengan hati-hati lalu gel dimasukkan pada kotak *running*. Selanjutnya ke dalam kotak *running* ditambahkan TBE 1x sampai menggenangi gel. Sumuran pada gel diletakkan di dekat anoda (-) biasanya warna hitam, karena arus listriknya mengalir dari anoda (negatif) ke katoda (positif). *Loading dye* di-spot di atas parafilm sebanyak empat spot, tiga untuk sampel, dan satu untuk marker masing-masing 1  $\mu$ L. Sebanyak 3  $\mu$ L sampel diambil kemudian dihomogenkan dengan *loading dye* dengan cara di-*pipeting*, lalu dengan hati-hati dimasukkan ke dalam sumur gel. Sebanyak 1  $\mu$ L marker diambil kemudian dihomogenkan dengan *loading dye* dengan cara dipipet, lalu dengan hati-hati dimasukkan ke dalam sumur gel. Sampel dielektroforesis pada tegangan 50 V selama 60 menit. Setelah 60 menit, gel diangkat menggunakan spatula, kemudian gel diletakkan di dalam UV transmitter untuk dilihat dan diambil gambarnya.

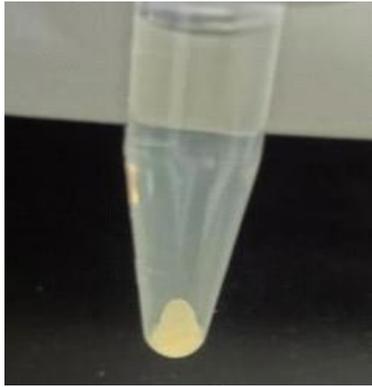
### HASIL DAN BAHASAN

Produksi dsRNA dilakukan melalui teknologi kloning gen pengkode VP-15 pada vektor yang telah mengandung promoter T7 sebagai promoter teknologi RNAi, dan selanjutnya ditransformasi ke bakteri rekombinan, (Parenrengi *et al.*, 2018). Produksi dsRNA VP-15 selanjutnya diperbanyak secara *in-vivo* pada plasmid bakteri rekombinan. Penyiapan dsRNA diawali dengan kultivasi bakteri yang mengandung plasmid vaksin dsRNA VP-15. Untuk inang *E. coli*, umumnya bakteri dikultur selama 16-18 jam,

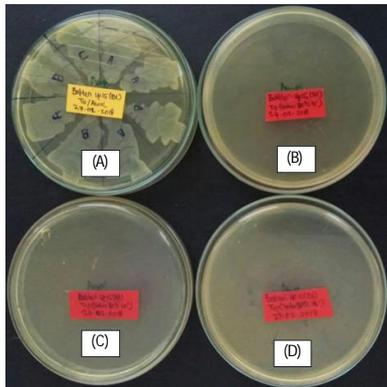
karena pada umur tersebut pertumbuhan bakteri berada dalam fase eksponensial. Pemanenan sel pada jam tersebut bertujuan untuk memperoleh jumlah sel yang memadai sebagai sumber plasmid. Namun, sebelum plasmid dipanen, bakteri dimatikan dengan metode pemanasan pada waktu tertentu. Tujuannya adalah untuk mengonfirmasi waktu pemanasan yang tepat agar diperoleh vaksin dsRNA VP-15 yang tidak rusak karena efek lama pemanasan dan tidak mengandung bakteri dari plasmid. Sehingga pada saat diaplikasikan pada udang windu dapat berfungsi secara efektif. Selanjutnya pemanenan sel dilakukan dengan sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas, (Mujayana & Nurjanna, 2015). Seperti yang terlihat pada Gambar 3.

Untuk meyakinkan bahwa bakteri telah mati tetapi konstruksi gen VP-15 tidak rusak maka dilakukan verifikasi penumbuhan kembali bakteri setelah dipanaskan selama 5, 10, dan 15 menit, serta kontrol (tanpa pemanasan). Hasil percobaan menunjukkan bahwa bakteri rekombinan pembawa konstruksi VP-15 akan mati setelah pemanasan 80°C selama 5-15 menit, sedangkan tanpa pemanasan pertumbuhan bakteri berjalan dengan normal (Gambar 4).

Selain verifikasi vaksin dsRNA melalui penumbuhan bakteri di media spesifik untuk bakteri rekombinan, analisis juga dilakukan melalui isolasi plasmid DNA pada berbagai waktu inkubasi pemanasan. Isolasi plasmid DNA dapat dilakukan secara konvensional maupun dengan menggunakan kit. Pada kegiatan ini isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial untuk mempermudah dan mempercepat proses isolasi DNA. Keberadaan fragmen DNA pada posisi yang diinginkan merupakan indikator bahwa konstruksi

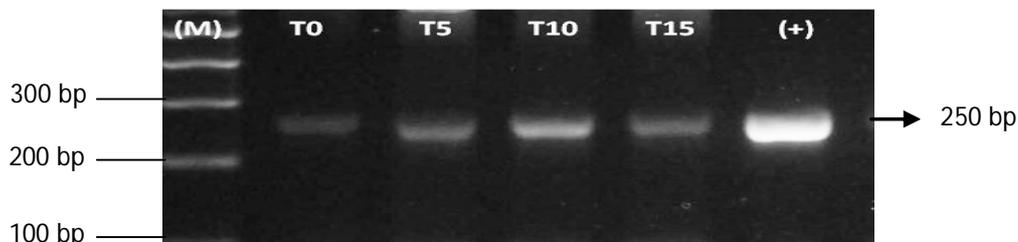


Gambar 3. Bakteri yang telah disentrifugasi.



Gambar 4. Verifikasi metode mematikan bakteri rekombinan melalui pemanasan pada suhu 80°C melalui analisis penumbuhan bakteri (kontrol tanpa pemanasan (A), pemanasan selama lima menit (B), pemanasan selama 10 menit (C), dan pemanasan selama 15 menit (D)).

DNA dalam plasmid tidak rusak akibat pemanasan (Parenrengi, *et al.*, 2018). Untuk lebih meyakinkan posisi fragmen DNA dsRNA pada berbagai lama pemanasan maka digunakan kontrol positif (Gambar 5).



Gambar 5. Fragmen plasmid DNA dari VP-15 (250 bp) pada semua perlakuan (M= marker 100 bp plus, T-0= kontrol tanpa pemanasan, T-5= pemanasan selama lima menit, T-10= pemanasan selama 10 menit, T-15= pemanasan selama 15 menit, (+)= kontrol positif WSSV).

Dari hasil kegiatan, plasmid DNA dari VP-15 tidak mengalami kerusakan sampai dengan pemanasan 80°C selama 15 menit walaupun bakteri sudah mati, hal ini bisa terlihat dari adanya fragmen plasmid DNA dari VP-15 yang berada pada posisi sekitar 250 bp (*base pair*) pada semua perlakuan (T-0—T-15).

### KESIMPULAN

Pada proses penyiapan vaksin dsRNA dengan metode pemanasan pada suhu 80°C, pemanasan 5-15 menit dapat mematikan bakteri rekombinan, namun konstruksi gen VP-15 tidak rusak. Hal ini ditunjukkan dengan bakteri yang tidak tumbuh setelah dipanaskan dan terdeteksinya fragmen plasmid DNA dari VP-15 pada posisi sekitar 250 bp.

### SARAN

Untuk efisiensi waktu, maka penyiapan vaksin dsRNA dengan cara mematikan bakteri pada suhu 80°C cukup dilakukan selama lima menit.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ketua Kelompok Peneliti Bioteknologi Bapak Dr. Andi Parenrengi, Ibu Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum, M.P., dan Ibu Andi Tenriulo, M.Si. yang telah membimbing dalam menyelesaikan tulisan ini.

### DAFTAR ACUAN

- Aonullah, A.A., Nuryati, S., Alimuddin, & Murtini, S. (2016). Efficacy of koi herpesvirus DNA vaccine administration by immersion method on *Cyprinus carpio* field scale culture. *Aquaculture Research*, p. 1-8.
- Mujayana & Nurjanna. (2015). Teknik isolasi DNA plasmid dari bakteri terkonstruksi gen antivirus *PmAV*. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 13(1), 67-71.
- Parenrengi, A., Mulyaningrum, S.H.R., Tenriulo, A., & Nawang, A. (2018). Gen penyandi viral protein 15

- (VP-15) *white spot syndrome virus* (WSSV) dan aplikasinya sebagai vaksin rekombinan pada udang windu. *Jurnal Riset Akuakultur*, 13(1), 57-65.
- Parenrengi, A. (2018). Perbaikan sistem produksi larva SPF dan peningkatan resistensi udang windu. Laporan Teknis Kegiatan 2018, hlm. 1-86.
- Tenriulo, A., Tampangallo, B.R., Parenrengi, A., & Dewi, R.A. (2016). 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.
- van-Hulten, M.C.W., Reijns, M., Vermeesch, A.M.G., Zandbergen, F., & Vlak, J.M. (2002). Identification of VP-19 and VP-15 of *white spot syndrome virus* (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 83, 257–265.
- Yusuf, B., Nur, A.M., Yunitasari, N.F., Widiastuti, T.A., & Pupitasari, E. (2014). Stabilitas gen *gag-ca* virus jembrana pada vektor plasmid rekombinan pcDNA-ca dalam *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  setelah penyimpanan selama delapan tahun. *Jurnal Sain Veteriner*, hlm. 1-8.