

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN PENYANDI PROTEIN
STRUKTURAL VP24 *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada
UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabricus, 1798).**

SKRIPSI

**RIANA ANDANG DEWI
L 221 08 258**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN PENYANDI PROTEIN
STRUKTURAL VP24 WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) PADA
UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798)**

RIANA ANDANG DEWI

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana
pada
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : **Isolasi Dan Karakterisasi Gen Penyandi VP24 White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798)**

Nama : **Riana Andang Dewi**

Stambuk : **L 221 08 258**

Prog. Studi : **Budidaya Perairan**

Skripsi Telah Diperiksa dan Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Asmi Citra Malina, S.Pi, M.Agr, Ph.D
NIP. 197212282006042001

Bunga Rante Tampangallo S.Pi M.Si
NIP. 197611092006042001

Mengetahui,

Dekan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan,

Ketua Program Studi
Budidaya Perairan,

Prof. Dr. Ir. Andi Niartiningasih, MP.
NIP. 196112011987032002

Dr.Ir. Siti Aslamyah, MP.
NIP. 196909011993032003

Tanggal Lulus: 20 Agustus 2013

RIWAYAT HIDUP



Riana Andang Dewi lahir di Maros pada Tanggal 20 Januari 1988. Penulis merupakan Anak kelima dari enam bersaudara pasangan **H.Wela Puseng** dan **Hj.Jumiati Ishak**. Menempuh karir dibidang pendidikan formal di Sekolah Dasar Negeri 01 Batangase dan lulus pada tahun 2001. Melanjutkan Sekolah Menengah Pertama di MTS Negeri 02 dan lulus di tahun 2004. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 06 Makassar dan lulus pada tahun 2007. Kemudian di tahun 2008 penulis melanjutkan studi di Perguruan Tinggi Negeri Universitas Hasanuddin melalui jalur Seleksi Nasional Mahasiswa Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) pada Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Selama menjadi Mahasiswi, penulis pernah mengikuti kegiatan baik untuk kegiatan formal maupun non formal di korps asisten Genetika dan Pemuliabiakan ikan serta Himpunan Mahasiswa Profesi Budidaya Perairan Unhas (HMP BDP-UH). Untuk menyelesaikan masa studinya, penulis mengambil judul penelitian **Isolasi dan Karakterisasi Gen Penyandi Protein Struktural VP24 *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus, 1798).**

ABSTRAK

RIANA ANDANG DEWI. L22108258. Isolasi dan Karakterisasi Gen Penyandi Protein Struktural VP24 White Spot Syndrome Virus (WSSV) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798). Di bawah bimbingan **Asmi Citra Malina** sebagai pembimbing utama dan **Bunga Rante Tampangallo** sebagai pembimbing anggota.

WSSV merupakan patogen yang telah menghancurkan industri udang windu di berbagai Negara termasuk Indonesia. Isolasi dan karakterisasi gen penyandi protein struktural VP24 WSSV merupakan gen yang mengkode salah satu sifat dari protein struktural mayor yang berada di intermedit virus. Tujuan dari penelitian ini untuk mengkarakteristik gen penyandi protein struktural VP24 WSSV yang diisolasi dari udang windu, *Penaeus monodon*. Perlu diketahui penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2013 di Laboratorium Bioteknologi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros, Sulawesi Selatan. Genom DNA WSSV diisolasi dari kaki renang dan kaki jalan udang windu yang dipelihara di Tambak Takalar dengan menggunakan metode ekstraksi DTAB-CTAB (*Dodecyl Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide - Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Gen tersebut diisolasi dengan menggunakan mesin *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dilanjutkan proses sekuensing. Data yang dihasilkan dianalisis dengan menggunakan program Genetyx Versi 7 dan *basic local alignment search tool* (BLAST). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen penyandi VP24 WSSV berhasil diisolasi dari udang windu asal Takalar memiliki panjang sekuen sekitar 627 bp yang mengkodekan 215 asam amino. BLAST-N menunjukkan tingkat similaritas yang identik (99%) antara gen VP24 asal Indonesia dengan gen VP24 asal Negara Meksiko yang ada di data base Bank Gen. Maka dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA hasil amplifikasi PCR tersebut merupakan sekuens gen penyandi protein struktural VP24 WSSV. Gen ini diyakini mampu mengkode karakter penting penyakit WSSV yang utama yaitu VP24.

Kata kunci: Udang Windu, Penyakit, WSSV, isolasi, karakterisasi, gen VP24 WSSV.

ABSTRACT

RIANA ANDANG DEWI. L22108258. Isolation and Characterization Structural Protein Encoding Gene VP24 of White Spot Syndrome Virus (WSSV) of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798). Under supervise by **Asmi Citra Malina** as the primary supervisor/chief and **Bunga Rante Tampangallo** as secondary supervisor/member.

WSSV is kind of pathogen that has destroyed tiger shrimp industry in various countries including Indonesia. The isolation and characterization structural protein encoding gene VP24 of WSSV VP24 is a gene which encode for one the properties of the mayor structural protein which are the located in the intermediate. This study aims to characterizethe encoding gene of the structural proteins WSSV VP24 isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. This research had been carried out in Laboratorium Bioteknologi Balai Penelitian and Pengembangan Air Payau (BBPPAP) Maros, South Sulawesi. WSSV genomic DNA isolated from the pleopod and periopod tiger shrimp reared in Takalar's pounds, using DTAB-CTAB extraction method. The gene isolated by using PCR, followed by secuencing process. The data result is analyzed by using GENETYX program 7th version and BLAST. The result showed that VP24 encondin genes were successfully isolated from black tiger shrimp Takalar origin with 627 bp sequences length which 215 amino acid's. BLAST-N program showed that VP24 Indonesia isolate (Takalar region) had similarity with 99% score identity between the VP24 genes from Indonesia to the VP24 Mexico stage origin in the data base of gene bank. It can be concluded that the result of PCR amplification of DNA fragment's is a gene sequence encoding the structural protein of VP24 WSSV. This gene is believed capable to encode important character's of main disease, VP24 WSSV.

KEY WORDS: *Penaeus monodon*, disease, WSSV, Isolation, characterization, Gene VP24 WSSV

KATA PENGANTAR



Tiada kata yang pantas terucap selain memanjatkan rasa puji dan syukur kehadiran Allah SWT karena berkat Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi ini yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Gen Penyandi Protein Struktural VP24 *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798)** dapat selesai sesuai dengan yang diharapkan.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah terlibat dan banyak memberikan bantuan sejak perencanaan, persiapan, pelaksanaan hingga penyusunan skripsi ini, antara lain :

1. Ibu **Asmi Citra Malina, S.Pi, M.Agr,Ph.D**, selaku pembimbing utama atas bimbingan, arahan, waktu, dan kesabaran yang telah diberikan kepada Penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Ibu **Bunga Rante Tampangallo, S.Pi, M.Si**, sebagai pembimbing anggota yang telah bersedia membantu, mendampingi, dan banyak memberi masukan pada penulis.
3. Ibu **Ir. Margaretha Bunga,MP.**, Ibu **Dr.rer.nat. Elmi N. Zainuddin, DES.**, dan Ibu **Andi Aliah Hidayani, S.Si,M.Si** selaku penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik dalam penyusunan skripsi ini..
4. Ibu **Prof. Dr Ir. Hj. Andi Niartiningi,MP**, selaku Dekan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.
5. Bapak **Prof. Dr. Ir. Nadjamuddin, M.Sc.**, selaku Pembantu Dekan I Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar.

6. Ibu **Dr. Ir. St. Aslamyah.,MP** selaku Ketua program Studi Budidaya Perairan, Universitas Hasanuddin, Makassar.
7. Seluruh staf pegawai dan teknisi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros khususnya Bapak **Andi Parenrengi** dan Ibu **Andi Tenriulo** atas saran dan arahan yang diberikan kepada Penulis selama pelaksanaan Penelitian.
8. Teman penelitianku **Anny Hary Ayu, Ririn D. Rera, A. Ninnong Renita,** dan **Ni Putu Linda**, terima kasih atas kerja samanya selama penelitian. Serta seluruh teman – teman di Jurusan Perikanan terkhusus untuk **BDP 2008 dan 2009**.
9. Saudara-saudaraku **Dodi Tri Ramadhan, Muh.Faisal, Rahmawati, Anti Milayanti,** dan **Nurlina** yang telah memberikan doa, perhatian, semangat dan bantuan moril maupun materil serta mencurahkan perhatian lebih kepada penulis.
10. Secara khusus penulis haturkan sembah sujud dan terima kasih yang tak terhingga kepada Ayahanda **Wela Puseng** dan Ibunda **Jumiati Ishak** atas kasih sayang dan tulus serta memberikan doa dan segalanya.

Penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca, Amin Ya Rabbal alamin.

Makassar, Agustus 2013

Riana Andang Dewi

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
I. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan dan kegunaan	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
A) Karakteristik Udang Windu	3
1. Klasifikasi	3
2. Morfologi	3
3. Biologi	4
4. Siklus Hidup	6
B) WSSV (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS)	6
1. Sifat-sifat Umum dan Morfologi	6
2. Proses Terjadinya WSD (<i>White Spot Dease</i>)	8
3. Perubahan Jumlah Total Hemosit Udang yang Terinfeksi	9
4. Karakteristik Genom WSSV	10
5. Protein Struktural	13
6. Protein Struktural VP24 WSSV	15
C) Pengertian dan Struktur DNA	17
D) PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
1. Prinsip Metode PCR	19
2. Proses Kerja di dalam PCR	20
3. Komponen-Komponen untuk Reaksi PCR	22
E) Elektroforesis	23
F) Pencegahan Penyakit pada Udang Windu	25
1. Vaksinasi	25
2. Immunostimulan	27
III. METODE PENELITIAN	28
A) Waktu Dan Tempat	28
B) Materi Penelitian	28
C) Prosedur Penelitian	29
D) Analisis Data	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
A) Kemurnian dan Konsentrasi Gen	34
B) Visualisasi Hasil Elektroforesis	35
C) Analisis Urutan Nukleotida Gen Penyandi VP24.....	40
D) Analisis Kodon Asam Amino Gen Penyandi VP24 WSSV	42
E) Analisis Filogenetik Gen VP24	45
V. PENUTUP	48
Kesimpulan	48
Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Hal
1	Morfologi Udang Windu	3
2	Siklus Hidup Udang Windu	6
3	Foto Mikroskop Elektron Suatu Virion WSSV	7
4	Genom WSSV (WSBV)	11
5	Skema Representasi Beberapa Protein Virion WSSV Struktural Yang Menyusun Suatu Virion	14
6	Untai DNA Pada Saat Mengalami Denaturasi	20
7	Penempelan Primer Dengan Untai DNA yang telah terdenaturasi	21
8	Perpanjangan DNA secara semi-konservatif	22
9	Hasil PCR WSSV pada udang windu	36
10	Hasil elektroforesis fragmen DNA gen VP24 WSSV yang diisolasi dan DNA udang windu (<i>P.monodon</i>)	39
11	Hasil sekuensing gen penyandi VP24 WSSV pada udang windus	41
12	Sekuen deduksi asam amino penyandi gen <i>VP24 WSSV</i>	43
13	Filogenetik gen VP24 WSSV menunjukkan kekerabatan dengan beberapa gen VP24 WSSV yang ada di Gen Bank.....	45

DAFTAR TABEL

No	Teks	Hal
1	Alat dan Bahan	28
2.	Kemurnian dan Konsentrasi Gen WSSV	34

I. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Perikanan merupakan suatu kegiatan perekonomian yang memanfaatkan sumber daya perairan dengan menggunakan ilmu pengetahuan serta teknologi bagi kesejahteraan manusia dengan mengoptimalkan dan memelihara produktivitas sumber daya ikan dan kelestarian lingkungan. Salah satu komoditas perikanan Indonesia yang sampai saat ini menjadi primadona adalah udang windu (*Penaeus monodon*), sehingga pengembangannya budidaya udang windu yang cukup besar di Indonesia akan tetapi mengalami penurunan produksi.

Pada tambak udang intensif, efek patogenitas akan semakin meningkat karena penerapan tingkat kepadatan yang tinggi, lingkungan buruk serta manajemen pemberian pakan yang tidak tepat sehingga menyebabkan penurunan kualitas lingkungan. Upaya penanggulangan penyakit dengan penggunaan obat-obatan dan antibiotik telah dilakukan, tetapi tidak efektif lagi, karena pada dosis tertentu justru berdampak negatif pada udang itu sendiri, bahkan dapat menimbulkan resistensi bagi virus dan bakteri. Penggunaan vaksin dan immunostimulan juga telah digunakan untuk merangsang peningkatan kekebalan non-spesifik pada udang windu (Atmomarsono, 2004). Selain itu, upaya pendekatan genetik melalui teknologi konvensional seperti seleksi, perbaikan teknik budidaya dan nutrisi juga telah banyak dilakukan. Berbagai macam organisme patogen (mikroorganisme) penyebab penyakit infeksi pada akuakultur adalah parasit, fungi, bakteri, dan virus. Menurut Sritunyaluksana, dkk (2006) jenis penyakit yang paling membahayakan dalam budidaya udang windu adalah penyakit WSSV (*White Spot Syndrome Virus*).

WSSV merupakan patogen yang telah menghancurkan industri udang windu di berbagai negara (Yi *dkk.*, 2004). Virus ini sangat ganas dan sangat sulit dihentikan (Chang *dkk.*, 1996). WSSV adalah virus DNA *double stranded* yang memiliki sirkuler yang besar dan terdiri atas 300 Kbp dengan virion-virion yang menyerupai *Baculoviridae* (van Hulten *dkk.*, 2000). Partikel WSSV terdiri atas lima protein struktural mayor yang dinamai menurut ukurannya didalam SDS-PAGE yaitu VP28, VP26, VP24, VP19, dan VP15 (Zuidema *dkk.*, 2004). VP19 dan VP28 berlokasi di pembungkus virion (*envelope*), VP26 dan VP24 menunjukkan protein *integument* sedangkan VP15 merupakan protein nukleokapsid (Tsai *dkk.*, 2005).

Meskipun gen penyandi protein struktural VP24 WSSV sudah tergolong lama dikenal berbagai negara lain seperti di Jepang, Thailand, dan Cina akan tetapi di Indonesia sendiri masih tergolong baru. Walau pernah dilakukan penelitian namun hanya sebagian kecil yang membahas mengenai protein virus, seperti VP19, VP26 dan VP28 sedangkan VP24 sama sekali belum pernah diteliti di Indonesia. Maka dari itu, penelitian isolasi dan karakterisasi gen penyandi protein permukaan VP24 *white spot syndrome virus* (WSSV) perlu dilakukan.

Tujuan dan Kegunaan

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi gen penyandi protein permukaan VP24 WSSV pada udang windu (*Penaeus monodon*).

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan informasi dasar untuk melakukan program pencegahan penyakit dalam rangka memperoleh udang yang tahan terhadap penyakit.

II. TINJAUAN PUSTAKA

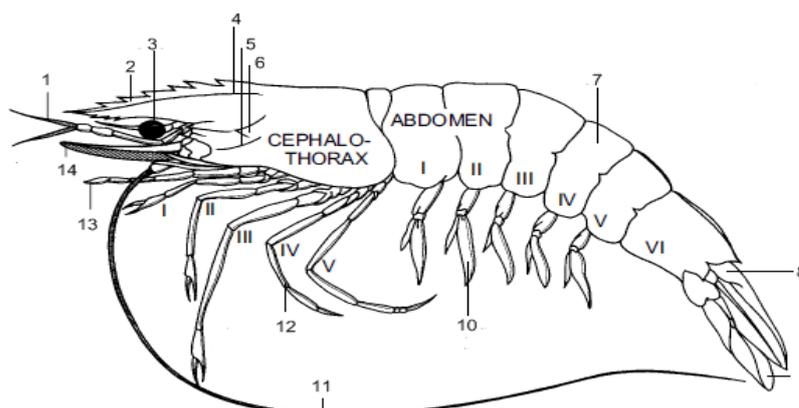
Karakteristik Udang windu (*Penaeus monodon*)

a. Klasifikasi Udang windu

Menurut Martosudarmo dan Ranoemiharjo (1998), secara taksonomi udang windu dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Filum	: Arthropoda
Klas	: Krustasea
Sub klas	: Malacostraca
Super Ordo	: Eucarida
Ordo	: Decapoda
Family	: Panaeidae
Sub Famili	: Penainae
Genus	: <i>Penaeus</i>
Spesies	: <i>Penaeus monodon</i>

b. Morfologi Udang windu



Gambar 1. Morfologi Udang Windu (*P. monodon*)

Keterangan Gambar: 1. Antennula (sungut kecil); 2. Rostrum; 3. Mata; 4. Adostrual carina; 5. Hepatic carina; 6. Hepatic spine; 7. Abdomen; 8. Ujung ekor; 9. Ekor kipas; 10. Kaki renang; 11. Antenna (sungut); 12. Kaki jalan; 13. Alat-alat pembantu rahang (maxilliped); 14. Antenna scale (*Primavera*, 1990) dalam Braak (2002).

Udang windu memiliki ciri-ciri antara lain; kulitnya tebal dan keras dengan warna bervariasi dari coklat muda sampai biru keabuan dengan garis-garis loreng hitam atau abu-abu tua pada abdomennya. Tubuhnya agak melengkung (bengkok). Udang windu mempunyai 2 bagian utama yaitu bagian kepala yang menyatu dengan dada yang disebut *cephalothorax* dalam bagian tubuh sampai ekor disebut *abdomen* (Tricahyo, 1995).

c. Biologi udang windu

Udang windu memiliki saluran pencernaan yang terbagi menjadi usus bagian depan (*foregut*), usus bagian tengah (*midgut*) dan usus bagian belakang (*hindgut*). Penyerapan nutrisi dalam tubuh udang terjadi pada usus bagian tengah (*midgut*). Pada usus bagian tengah ini terdapat hepatopankreas yang berfungsi menghasilkan enzim pencernaan yang berfungsi untuk menghidrolisis nutrisi makanan dan membantu pemecahannya (Millamena *dkk.*, 2002).

Udang windu memiliki sifat-sifat dan ciri khas yang membedakannya dengan udang-udang yang lain. Udang windu bersifat *Euryhaline*, yakni secara alami bisa hidup di perairan yang berkadar garam dengan rentang yang luas, yakni 5-45 ‰. Kadar garam ideal untuk pertumbuhan udang windu adalah 19-35 ‰. Sifat lain yang juga menguntungkan adalah ketahanannya terhadap perubahan suhu yang dikenal sebagai *eurythermal* (Suyanto dan Mujiman, 2004).

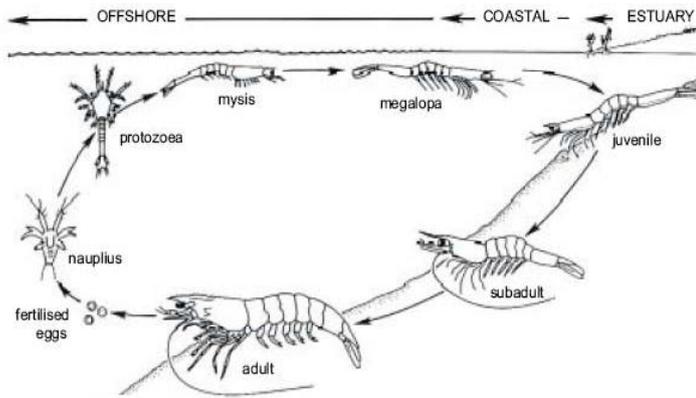
Udang merupakan organisme yang aktif mencari makan pada malam hari (*nocturnal*). Jenis makannya sangat bervariasi tergantung pada tingkatan umur udang. Pada stadia benih, makanan utamanya adalah plankton (fitoplankton dan zooplankton). Udang dewasa menyukai daging binatang lunak atau *mollusca* (kerang, tiram, siput), cacing, *annelida* yaitu cacing *Polychaeta*, dan krustasea. Dalam usaha budidaya, udang mendapatkan makanan alami yang tumbuh di tambak, yaitu klekap, lumut, plankton, dan benthos. Udang akan bersifat kanibal

bila kekurangan makanan (Soetomo, 1990).

Pada siang hari, udang hanya membenamkan diri pada lumpur maupun menempelkan diri pada sesuatu benda yang terbenam dalam air (Soetomo, 1990). Apabila keadaan lingkungan tambak cukup baik, udang jarang sekali menampakkan diri pada siang hari. Apabila pada suatu tambak udang tampak aktif bergerak di waktu siang hari, hal tersebut merupakan tanda bahwa ada yang tidak sesuai dengan sifat asli udang yang aktif pada malam hari. Ketidakesuaian ini disebabkan oleh jumlah makanan yang kurang, kadar garam meningkat, suhu meningkat, kadar oksigen menurun, ataupun karena timbulnya senyawa-senyawa beracun (Suyanto dan Mujiman, 2004).

Udang windu mengalami perubahan stadia dalam proses perkembangannya. Udang windu tumbuh menjadi dewasa dan memijah ditengah laut. Telur udang yang telah dihasilkan kemudian disimpan pada bagian punggung dari *abdomen* betina. Bila telur tersebut telah matang dan siap untuk dibuahi maka dikeluarkan melalui saluran telur (*oviduct*) yang terdapat pada bagian pangkal dari pasangan kaki jalan ke tiga. pada saat telur dikeluarkan, secara bersamaan *spermatofor* dipecahkan oleh induk betina, sehingga terjadilah pembuahan. Telur yang telah dibuahi akan menetas dalam waktu 12-15 jam dan berkembang menjadi larva. Proses perubahan stadia udang windu yaitu telur menetas dalam waktu 16 jam setelah pembuahan. Tahap larva terdiri dari nauplius (6 tahapan dalam 2 hari), zoea (3 tahap dalam 5 hari), mysis (3 tahap dalam 4-5 hari dan postlarva (6-35). Transisi dari juvenil ke udang muda membutuhkan 135-255 hari kemudian menyelesaikan kematangan seksual terjadi dalam 10 bulan (Motoh, 1984) dalam (Braak, 2002).

d. Siklus Hidup Udang windu



Gambar 2 : Siklus hidup udang windu (*Penaeus monodon*)
(Motoh, 1984) dalam (Braak, 2002)

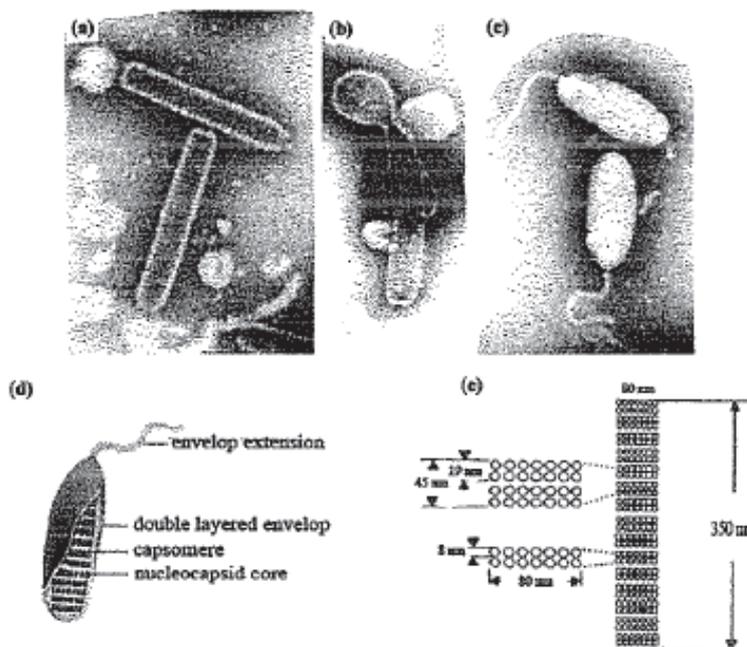
Udang muda (juvenil) bermigrasi ke daerah pantai setelah telur-telur menetas, larva hidup di laut lepas menjadi bagian dari zooplankton. Saat stadium *post larva* mereka bergerak ke daerah dekat pantai dan perlahan-lahan turun ke dasar di daerah estuari dangkal. Perairan dangkal ini memiliki kandungan nutrisi, salinitas dan suhu yang sangat bervariasi dibandingkan dengan laut lepas. Setelah beberapa bulan hidup di daerah estuari, udang dewasa kembali ke lingkungan laut dalam dimana kematangan sel kelamin, perkawinan dan pemijahan terjadi (Millamena *dkk.*, 2002).

White Spot Syndrome Virus (WSSV)

a. Sifat-sifat Umum dan Morfologi WSSV

White spot syndrome disebabkan oleh virus yang mulai dikenal sekitar 8 tahun yang lalu. Beberapa nama virus penyebab matinya berbagai populasi udang penaeid di berbagai negara, kemungkinan merupakan virus yang sama dengan nama yang berbeda (Zuidema *dkk.*, 2004) yaitu *white spot baculovirus* (WSBV) dari Taiwan di tahun 1992 (Chou *dkk.*, 1995; Wang *dkk.*, 1995), *hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus* (HHNBV) serta *Chines baculovirus* (CBV) dari Cina ditahun 1993 (Wang *dkk.*, 1995; Nadala *dkk.*, 1998),

rhod-shape virus Penaeus japonicus (RV-PJ) atau *penaeid rod-shaped DNA virus* (PRDV) dari Jepang ditahun 1993 (Inouye *dkk.*, 1996), dan *systemic ectodermal and mesodermal baculovirus* (SEMBV) dari Thailand ditahun 1993 (Wongteerasupaya *dkk.*, 1995).



Gambar 3: Foto mikroskop elektron suatu virion WSSV. a) *Nukleokapsid* telanjang tanpa *envelope*; b) suatu pecahan *virion* dimana lebih dari separuh *nukleokapsid* masih berada diluar *envelope*; c) suatu *virion* WSSV utuh dengan karakteristik sebuah ekor pada salah satu ujung *virion*; d) dan e) struktur-struktur partikel WSSV (Huang *et al.*, 2001 : Zuidema *et al.*, 2004).

Sekarang ini, umumnya kelompok penelitian menggunakan nama *white spot syndrome virus* (WSSV) untuk virus ini. (Zuidema *dkk.*, 2004). Awalnya, WSSV digolongkan sebagai bagian dari Baculoviridae (Francki *dkk.*, 1991). Namun, berdasarkan keunikan morfologi dan fitur genetiknya, WSSV digolongkan ke dalam *family* virus baru yaitu Nimaviridae yang terdiri dari satu genus (*Whispovirus*) dan satu spesies yaitu *White spot syndrome virus* (Vlak *dkk.*, 2003). Nama *family* mencerminkan corak fisik WSSV yang sangat khas yaitu adanya *multifilament* menyerupai sebuah ekor yang terdapat salah satu ujung *virion* WSSV.

White spot syndrome adalah virus DNA sirkuler utas ganda (Zhang *dkk.*, 2000). WSSV termasuk virus berukuran besar dengan ukuran 80-120 X 250-380 nm (Inouye *dkk.*, 1996). Virion WSSV berbentuk batang dengan kedua ujung tumpul membulat (elips), memiliki pembungkus (*envelope*) dengan corak yang khas yaitu terdapat tambahan *multifilament* menyerupai sebuah ekor menempel pada ujung virion yang ramping. WSSV memiliki *nukleokapsid* tunggal berbentuk *silinder* dengan ukuran sekitar 350 x 80 nm yang dibentuk oleh banyak cincin dengan jumlah keseluruhan sekitar 14 cincin. Masing-masing cincin disusun oleh dua baris subunit-subunit *globuli* secara paralel berdiameter 8 nm dengan jarak yang teratur (Huang *dkk.*, 2001). *Nukleokapsid* mengandung protein DNA dilapisi oleh suatu *capsid* khusus, terbungkus dalam satu pembungkus virus (*envelope*) membentuk virions (Durand *dkk.*, 1997).

b. Proses terjadinya penyakit WSD (white spot disease)

Selama penginfeksi WSSV, banyak gen yang melakukan *up-regulasi* mengimplikasikan bahwa udang sedang berusaha untuk melawan pengaruh dari serangan virus pada selnya. Hal ini termasuk LPS dan gen yang terikat dengan *β -1,3-glucan*, *gen lectin C-type*, *gen katalase*, *gen RAS-related nuclear protein*, *calreticulin*, *gen Rab GTPase*, *gen Mn-SOD*, *protein syntenin-like* bersama dengan partnernya *gen α -2 macroglobulin*, *gen anctin*, ALF atau factor anti-LPS (AMP dari belangkas, *Limulus polyphemus*), *gen fortilin*, *gen β -integrin*, *gen pmAV* dan *gen pmRab7*. Pada saat perlindungan dari *up-regulasi* gen berhasil dilakukan, hewan tersebut mengakomodasi infeksi virus tanpa adanya tanda atau gejala yang buruk. Akomodasi virus ini adalah salah satu teori yang menjelaskan mengapa udang yang tampak normal ternyata diinfeksi oleh berbagai virus.

Pra-inkubasi dari WSSV secara *sintetis* maupun secara alami yang disebabkan oleh *Peptida Anti-Mikroba* (AMP) pada *moluska* adalah salah satu contoh yang signifikan untuk mengurangi kematian yang disebabkan oleh WSSV yang mengesankan peranan perlindungan dari virus yang dilakukan oleh AMP. Peniadaan AMP dari belangkas yang juga ditemukan pada *crustacea decapods* seperti udang karang, ALF, juga menyebabkan meningkatnya perkembangan virus dari WSSV baik pada udang karang yang diujikan maupun kultur sel. ALF dari *Litopenaeus vannamei* juga up-regulasi pada saat infeksi WSSV. Rekombinan ALF juga menghambat masuknya virus dan pelepasan pada udang karang. Dari virus WSSV inilah yang menyebabkan timbul penyakit *White Spot Disease*.

c. Perubahan Jumlah Hemosit Total pada Udang Terinfeksi Virus WSSV

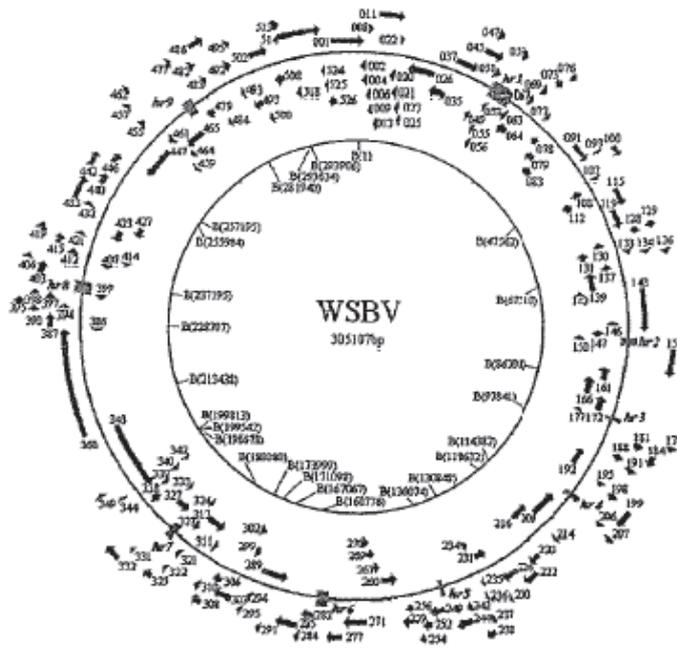
WSSV menyebar dalam tubuh udang melalui sirkulasi cairan hemolimfa, dapat menginfeksi banyak jaringan dan organ tubuh udang (Wang *dkk.*, 1999). Infeksi WSSV selalu menyebabkan terjadinya perubahan parameter hemolim. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ketika udang terinfeksi WSSV maka terjadi penurunan jumlah total hemosit (*Total Haemocyte Count/THC*) yang signifikan (Wongprasert *dkk.*, 2003). Lebih lanjut dicontohkan bahwa rata-rata THC udang sebelum terinfeksi WSSV adalah $20.9 \pm 0.7 \times 10^6$ sel/ml, tetapi jumlah ini berkurang signifikan dalam waktu antara 24 jam *pasca* infeksi. Pada udang yang terinfeksi WSSV ini, *apoptosis* juga terjadi didalam jaringan *hematopoietik*. Dengan demikian berkurangnya jumlah hemosit dalam darah udang diakibatkan oleh target serangan WSSV pada jaringan hematopoietik dan hemosit itu sendiri. Jumlah hemosit teramati mengalami penurunan sejak awal terjadi infeksi virus, bahkan sebelum sel-sel apoptosis terlihat jelas. Menurut Beckage (1996), hal ini dimungkinkan karena *crustacea* memiliki sistem imun

yang mampu memindahkan hemosit yang terinfeksi virus menuju ke jaringan-jaringan asal infeksi, termasuk pada periode awal infeksi dan mekanisme ini diaplikasi dalam kasus infeksi WSSV (Hennig *dkk.*, 1998). Van de Braak *dkk.*, (2002) dan Wongprasert *dkk.*, (2003) juga menggunakan mekanisme ini untuk menjelaskan sebab penurunan jumlah hemosit pada tahap awal infeksi. Hemosit berperan penting di dalam pertahanan seluler, sehingga kondisi THC yang rendah akan dapat memperlemah sistem imun udang dan menurunkan kondisi kesehatannya.

d. Karakteristik Genom WSSV

Pada tahun 1997, DNA genom WSSV berhasil dipurifikasi dari jaringan udang *P.Japonicus* untuk pertama kalinya di negeri China (Yang *dkk.*, 1997). Hasil pengurutan (*sequencing*) genom WSSV isolat China (WSSV-Ch) menunjukkan bahwa DNA genom WSSV-Ch berukuran sekitar 305 kb (AF332093) (Yang *dkk.*, 2001) (gambar 4). Ukuran genom ini berbeda dengan isolat Thailand (WSSV-Th) yaitu sekitar 293 kb (AF369029) (van Hulten *dkk.*, 2001) dan WSSV isolat Taiwan (WSSV-Tw) yaitu sekitar 307 kb (AF440570) yang merupakan virus DNA hewan yang ukurannya paling besar yang pernah dianalisis hingga saat ini (Chen *dkk.*, 2002a). Ketiga genom WSSV memiliki tingkat kemiripan (*Nukleotide identity*) mencapai 99% (Marks *dkk.*, 2004). Pada genom WSSV terdapat sembilan *homologous regions* (hrs) yang lokasinya menyebar di sepanjang genom (van Hulten *dkk.*, 2001b). Pada jenis *Baculovirus*, *homologous regions* ini memberi pengaruh dalam replikasi DNA (Pearson *dkk.*, 1992; Kool *dkk.*, 1993) dan merupakan *enhancer* transkripsi gen virus (Guarino dan Summers, 1986). Oleh karena itu, *homologous regions* (hrs) WSSV yang lokasinya menyebar di sepanjang genom seperti yang terdapat pada virus-virus DNA *sirkuler* berukuran besar lainnya (*Baculovirus* dan *Ascovirus*)

juga diperkirakan memiliki fungsi yang sama dalam *regulasi replikasi* dan *transkripsi* (van Hulten *dkk.*, 2001b).



Gambar 4: Genom WSSV (WSBV). Panah, menunjukkan posisi 181 ORF. Tanda kotak merupakan 9 *homologous regions* (*hrs*). Notasi B pada lingkaran sebelah dalam menunjukkan posisi situs *BamHI* dalam genom WSSV (Yang., *dkk.* 2001).

Daerah terjadinya delesi di dalam genom WSSV ditemukan pada titik 277,566-285,714 bp (Lan *dkk.*, 2002). Daerah delesi ini, biasanya berhubungan dengan *reduksi infeksiivitas virus*, rendahnya aktifitas replikasi, *reduksi aktivitas fusi sel dan reduksi virulensi*. Daerah ini mengandung lima ORF (*Open Reading Frame*) dan salah satu diantaranya diduga sebagai penyandi *nukleus-targetting protein* (Chen *at el.*, 2002a). Adanya daerah yang kaya dengan AT pada sambungan delesi menjadi *fasilitator* terjadinya rekombinasi (Lan *dkk.*, 2002).

Selain delesi, jumlah total *tandem repeat* dalam *homologous regions* (*hrs*) juga bervariasi antara ketiga isolat, sedangkan lokasi dan urutannya masih tetap sama. Tingginya keseragaman urutan *nukleotida* ketiga isolat, dapat dinyatakan bahwa suatu spesies WSSV tunggal bertanggung jawab terhadap terjangkitnya WSSV diseluruh dunia (Tsai *dkk.*, 2004; Marks *dkk.*, 2004). Daerah-daerah

homolog, variabel pengulangan dalam ORF, dan 13 kb daerah yang tidak stabil dapat digunakan untuk studi-studi *epidemiologis, evolusi* dan *ekologis* (Zuidema *dkk.*, 2004).

Berbeda dengan *baculovirus* (virus serangga) yang sudah diteliti dengan baik, pada WSSV hanya berperan beberapa gen yang telah dilaporkan (Zhang *dkk.*, 2002). Genom WSSV-Ch merupakan DNA sirkuler utas ganda dengan jumlah G+C mencapai 41% terdistribusi merata sepanjang genom. Tiga persen dari genom WSSV terdiri dari sembilan *homologous regions* (hrs) yang tersebar sepanjang genom dengan ukuran berbeda, sedangkan 97% sisanya merupakan daerah dengan sekuen yang unik (Yang *dkk.*, 2001) karena titik awal replikasi belum diketahui, suatu *residu guanin* yang terdapat pada bagian awal *fragmen* hasil pemotongan BamHI yang ukurannya paling besar ditetapkan sebagai titik awal peta fisik genom WSSV (Yang *dkk.*, 2001). Kedua utas DNA sirkuler WSSV mengandung jumlah ORF yang hampir sama (54% untuk forward, dan 46% untuk reverse).

Hanya 12 ORF yang memiliki *homologi* dengan gen-gen yang ada didalam *database publik*, yaitu pengkodean 2 *protein kinase* (PK) (Liu *dkk.*, 2010; van Hulten dan Vlask, 2001), DNA *polymerase* (DAN pol) (van Hulten *dkk.*, 2001b; Chen *dkk.*, 2002b), *collagen, thymidylate synthase, dUTPase, ribonucleotide reductase* berukuran besar (RR1) dan berukuran kecil (RR2) (van Hulten *dkk.*, 2000a; Tsai *dkk.*, 2000), *endonuklease* (Witteveldt *dkk.*, 2001), *claa I cytokine receptor, TATA-box-binding protein*. ORF ini menyandi sebagian besar enzim yang terlibat dalam metabolisme *nukleotida, biogenesis RNA, replikasi DNA* atau modifikasi protein. Delapan belas ORF menyandi protein-protein struktural, sedangkan sisanya belum diketahui dikarenakan adanya homologi dengan gen-gen yang telah diketahui. ORF (*Open Reading Frame*) merupakan salah satu metode yang biasa digunakan untuk mengetahui atau memahami

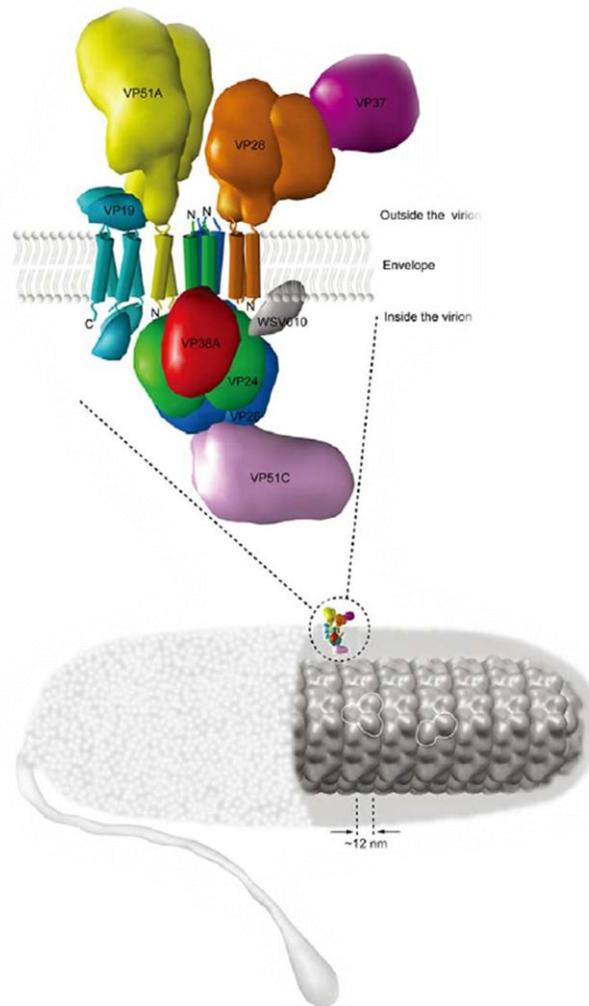
letak suatu gen dalam sekuen genom. ORF berada di kedua untai DNA yang berisi urutan kodon dimana kodon tersebut mengkode asam amino spesifik. ORF dimulai dengan kodon inisiasi yaitu ATG dan berakhir pada kodon terminasi yang biasanya TAA, TAG, atau TGA. Corak WSSV yang unik adalah memiliki ORF yang ukurannya sangat besar disusun oleh 18.234 pb nukleotida menyandi suatu protein dengan jumlah asam amino sebanyak 6077 asam amino yang belum diketahui fungsinya (van Hulten *dkk.*, 2001b).

Studi tentang transkripsi gen virus WSSV yang menginfeksi *P. Monodon* telah dilakukan (Zuidema *dkk.*, 2004). Dalam ekspresi gen WSSV dibagi dalam dua fase yaitu : 1) fase awal (*early phase*) yang terjadi sebelum DNA virus bereplikasi; 2) fase lanjut (*late phase*) terjadi ketika inisiasi replikasi DNA virus atau setelahnya. Gen-gen WSSV yang ditranskripsikan pada fase awal (*early phase*) meliputi RR1, RR2, PK, TK-TMK dan DNA pol, sedangkan gen-gen yang ditranskripsi pada fase lanjut (*late phase*) meliputi gen-gen menyandikan WSSV protein-protein struktural utama WSSV seperti VP28, VP26, VP24, VP19 dan VP15 (Alim, 2010). Ekspresi gen-gen yang termasuk dalam kelompok *early gen* teramati sejak 2 jam *pasca infeksi* WSSV, sedangkan gen-gen dalam kelompok *late gen* teramati setelah 18-24 jam *pasca infeksi*. Menurut Fitzgerald dan Shenk (1981), semua situs ada ujung 3' mRNA WSSV yang memiliki kesamaan dengan situs-situs poly-A mRNA eukariot yang secara khas berlokasi pada 15 hingga 25 nukleotida kearah *downstream signal poly-A*, AAUAAA.

e. Protein Struktural WSSV

Partikel WSSV terdiri atas lima protein struktural mayor yang dinamai menurut ukurannya didalam SDS-PAGE yaitu VP28, VP26, VP24, VP19, dan VP15 (Gambar 5) (Zuidema *dkk.*, 2004). VP19 dan VP28 berlokasi di

pembungkus virion (*envelope*), VP26 dan VP24 berlokasi intermedit sedangkan VP15 merupakan protein nukleokapsid (Tsai *dkk.*, 2005).



Gambar 5: Skema representasi beberapa protein struktural yang menyusun suatu virion. Kuning=VP51A, Jingga=VP28, Biru Muda=VP19, Merah=VP38A, Abu-abu=Wsv010, Nila=VP37, Ungu Muda=VP51C, Biru Tua= VP26, dan warna Hijau Tua= VP24 (Chang., *dkk* 2010)

Tidak satupun dari lima protein struktural mayor WSSV (VP28, VP26, VP24, VP19, dan VP15) terlihat mengalami *glikolisis* yang mana ini merupakan suatu hal yang tidak biasa terjadi pada virus-virus hewan yang memiliki pembungkus (van Hulten et al., 2002). Secara struktural, *nukleoprotein* (protein DNA) yang terdapat pada poros virion WSSV dikemas dalam suatu kulit kapsid

(capsid shell), yang diselubungi oleh suatu lapisan perantara (*intermediet*) dan suatu pembungkus terluar (*envelope*).

f. Protein Struktural VP24 WSSV

Protein struktural permukaan VP24 adalah salah satu dari lima protein struktural utama (mayor) yang dinamai menurut ukurannya di dalam SDS-PAGE yaitu VP28, VP26, VP24, VP19 dan VP15 (Zuidema *et al.*, 2004). VP24 merupakan bagian dari komponen protein *tegument* (intermedit) (Tsai *dkk.*, 2005), yang artinya VP24 mengisi ruang antara *envelope* dan *nukleokapsid*. Sejumlah pembuktian yang dilakukan penelitian sebelumnya meyakini bahwa VP24 merupakan protein *tegument*.

VP24 terletak di *integument* dengan titik *isoelektrik* 8,7 berdekatan dengan DNA virus yang diidentifikasi melalui SDS-PAGE (Marielle *dkk.*, 2000b), memiliki 627 nukleotida serta 208 asam amino (Kozak, 1989). Komputer analisis menunjukkan bahwa VP24 memiliki daerah *hidrofobik* yang kuat sehingga tidak dapat larut didalam air (Xie *dkk.*, 2006). Hasil uji pemurnian virus dan ekstraksi virion menyimpulkan bahwa ekstraksi virion menjadi larut air (hidrofilik) masuk dalam kategori protein *envelope* sedangkan ekstraksi virion yang tak larut (hidrofobik) merupakan *nukleokapsid* (van Hulten *dkk.*, 2000b). Selain itu, dalam uji *immunogold assay* yang dilakukan oleh Wang *dkk.*, (2004) didapatkan bahwa kebanyakan partikel emas tidak berada di permukaan luar (*envelope*) akan tetapi berada di dalam permukaan (*nukleokapsid*) serta pada lapisan intermedit (*tegument*). Hal itu dibenarkan dari hasil uji *immunogold assay* dilakukan oleh Xie dan Yang (2006) yang menemukan adanya partikel emas pada VP24. Maka dari itu, ini semakin membuktikan bahwa VP24 bukan bagian dari protein *envelope*.

Meskipun VP24 berada didalam permukaan WSSV, akan tetapi mampu bertindak seperti halnya VP28 (*envelope*). VP24 terlibat dalam mengenali

reseptor sel inang selama proses infeksi disekitar sistemik WSSV (pada awal penginfeksi) (Xie *dkk.*, 2006). Protein amplop virus telah menjadi faktor potensial yang melibatkan infeksi sistemik. Seperti yang diketahui bahwa fungsi gen *envelope* (pembungkus virion) sebagai pendeteksi dan pelekat. Awal terjangkitnya virus masuk yang pertama WSSV mencari reseptor yang sesuai sebagai tempat proses mereplikasi diri. Kemudian terjadi penyerapan (*absorpsi*) ke permukaan sel inang. Proses pelekatan tersebut berinteraksi dengan protein spesifik yang berada pada kapsid (Stansfield *dkk.*, 2003). Menurut Pelczar dan Chan (1986), proses pelekatan terjadi dalam dua langkah. Langkah pertama menyangkut pelekatan pendahuluan dengan ikatan atau muatan ionik dan dapat dengan mudah dibalikkan oleh pergeseran pH atau konsentrasi garam. Langkah yang kedua pelekatan yang lebih kuat dan tidak dapat dibalik. Protein pelekatan tersebut berinteraksi dengan protein atau polisakarida spesifik pada permukaan sel inang (Stansfield *dkk.*, 2003). Seperti VP28 yang mampu mengikat reseptor inang, tidak demikian dengan VP24. VP24 tidak mampu mengikat reseptor pada permukaan sel inang itu sendiri (Cun *dkk.*, 2003). Salah satu penelitian yang sebelumnya mengungkapkan bahwa VP24 bukan bagian dari *envelope*.

Hasil analisis komputer elektron mengemukakan sifat fisik dan kimia VP24, VP26, dan VP28 dapat dikatakan memiliki struktur protein yang mirip. Segmen trans-membran dan sinyal peptida diperkirakan memiliki posisi protein yang sama (Cun *dkk.*, 2003). Selain memiliki kemiripan sifat fisik dan kimia, VP24 memiliki hubungan interaksi dengan VP26 dan VP28. Untuk mengkarakterisasi sifat fungsional VP24, sebuah percobaan *far-western* dilakukan dengan menggunakan rVP24 (*recombinan* VP24). Protein virus yang dipisahkan oleh SDS-PAGE dan ditransfer ke membran dan *renatured* kemudian rVP24 diinkubasi sebagai negatif kontrolnya. Hasil menunjukkan bahwa ada interaksi antara VP24, VP26, dan VP28.

Hal itu dikarenakan adanya kesamaan yang cukup tinggi pada tingkat asam amino antara tiga struktur WSSV protein ini (VP24, VP26, dan VP28), sehingga ada alasan untuk diyakini bahwa ketiga struktur ini serupa. Kehadiran domain hidrofobik menunjukkan bahwa ketiga protein ini yang paling mungkin mampu membentuk *heteromultimers*. Sebuah cara untuk menjelaskan tingkat tinggi kesamaan asam amino dari tiga protein struktural WSSV adalah dengan mengasumsikan gen yang telah berevolusi dengan duplikasi gen dan *divergensi*.

Viral protein-24 (VP24) merupakan protein *integument* WSSV yang memiliki peran penting sebagai protein *linker* (penghubung) yang dapat menghubungkan beberapa struktural protein WSSV seperti VP28, VP26, dan Wsv010 sehingga terbentuk suatu pembungkus (*envelope*) yang kompleks yang dapat menyelimuti virus (Chen *dkk.*,2006). *Envelope protein* memiliki *transmembran* (Huang *dkk.*,2002a, Li *dkk.*,2005, Zhu *dkk.*, 2006) yang berfungsi sebagai pelekat dan pendeteksi.

Pengertian dan Struktur DNA

Materi genetik adalah bagian yang membawa informasi penentu sifat-sifat suatu organisme yang bertanggung jawab untuk memindahkan informasi genetik dari induk ke turunannya. DNA dan RNA sebagai materi genetik yang merupakan asam nukleat yaitu suatu polimer yang mengandung nukleotida. Nukleotida yang menyusun DNA dan RNA hampir sama kecuali pada gugus pentose dan basa nitrogen yang menyusunnya. Gugus gula pada DNA adalah Deoksiribosa sedangkan RNA adalah Ribosa, sedangkan gugus basa khas pada DNA adalah Timin dan pada RNA adalah Urasil (Fujaya, 1999).

DNA (*Deoxyribosa Nucleic Acid*) adalah *master molecul* (molekul utama) yang mengkode semua informasi yang dibutuhkan untuk proses metabolisme dalam setiap organisme. Molekul DNA ini terikat membentuk kromosom, dan

ditemukan nukleus, mitokondria dan kloroplas. DNA yang menyusun kromosom ini merupakan nukleotida rangkap yang tersusun heliks ganda (*double helix*), dimana basa nitrogen dan kedua benang *polinukleotida* saling berpasangan dalam pasangan yang tetap melalui ikatan hidrogen dan antara nukleotida satu dengan nukleotida yang lain dihubungkan dengan ikatan fosfat (Jamilah, 2005).

Lokasi basa saling berhadapan pada kedua rantai, Adenin hanya berpasangan dengan timin, guanin hanya dengan sitosin sedangkan bentuk alami RNA adalah serat tunggal yang memiliki sekuen basa yang komplementer dengan DNA, namun basa Timin pada DNA diganti menjadi Urasil pada RNA (Fujaya, 1999). DNA membawa informasi genetik dan bagian DNA yang membawa ciri khas yang diturunkan disebut gen. Perubahan yang terjadi pada gen akan menyebabkan terjadinya perubahan pada produk gen tersebut. Gen sering juga diartikan sebagai ruas DNA yang menghasilkan produk gen yang berupa enzim yang dikenal dengan teori satu gen satu enzim. Karena enzim dapat merupakan kombinasi polipeptida maka teori tersebut diubah menjadi satu gen satu polipeptida.

Isolasi DNA dapat dilakukan melalui tahap-tahap antara lain: Preparasi ekstrak sel, pemurnian DNA dari ekstrak sel dan presipitasi DNA (Jamilah, 2005). Menurut Ratnasari (2008), Isolasi DNA kromosom adalah memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Sumber DNA bisa dari tanaman, kultur mikroorganise, atau sel manusia.

Ekstraksi DNA dari organisme *eukaryota* (manusia, hewan dan tumbuhan) dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell walls*), penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*) dan pengendapan DNA (*precipitation of DNA*) dan pemanenan. Berbagai teknik ekstraksi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar tersebut, sehingga saat ini muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA. Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah

serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Hasil ekstraksi tersebut merupakan tahapan penting untuk langkah berikutnya (Paradisa, 2010).

Secara kimiawi penghancuran sel dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acid*), dan SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium (ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nukleas yang merusak asam nukleat). SDS merupakan sejenis deterjen yang berfungsi merusak membrane sel. Enzim proteinase K dapat digunakan untuk menghancurkan protein. Kotoran akibat lisis sel dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Molekul nukleotida (DNA dan RNA) yang telah terpisah dibersihkan dari protein yang masih ada dengan menggunakan phenol. Dalam proses ini sebagian kecil RNA juga dapat dibersihkan. Sedangkan *choloform* digunakan untuk membersihkan sisa-sisa protein dan polisakarida dari larutan. Enzim RNAase digunakan untuk menghancurkan RNA sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Pemurnian atau purifikasi DNA dapat dilakukan dengan mencampur larutan DNA tersebut dengan NaCl yang berfungsi memekatkan, memisahkan DNA dari larutan, dan mengendapkan DNA sewaktu dicampur dengan ethanol. Proses sentrifugasi dengan kecepatan tinggi akan mengendapkan tepung berwarna putih (DNA) dan menempel di dasar tabung ependorf (Albert, 1994).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prinsip metode PCR

PCR adalah teknik ilmiah dalam biologi molekular untuk memperkuat satu atau beberapa salinan sepotong DNA di beberapa kali lipat, menghasilkan ribuan sampai jutaan salinan tertentu urutan DNA. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

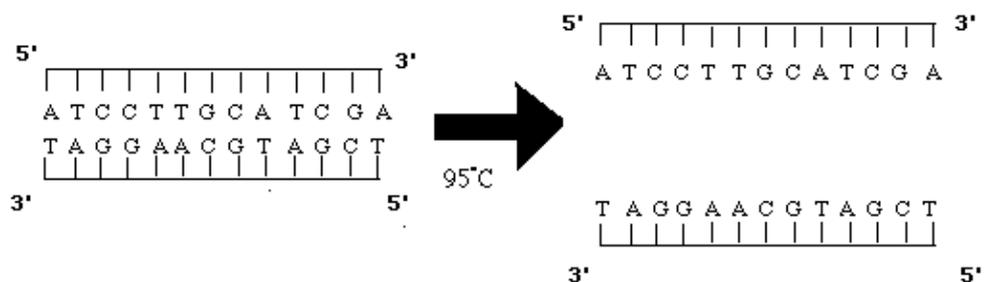
merupakan suatu teknik untuk mereplikasi DNA secara *in vitro*. Pertama kali ditemukan oleh Mullis tahun 1983. Teknik PCR merupakan revolusi teknologi DNA yang aplikasinya mencakup bidang agrikultur, forensik, dan untuk mendiagnosa penyakit pada manusia (Liu, 1998).

Proses amplifikasi PCR melibatkan variasi suhu yang mendekati suhu didih air, maka diperlukan enzim polimerase yang tetap stabil dalam temperatur yang tinggi (Kusuma, 2010).

Proses kerja didalam PCR

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang meliputi denaturasi, annealing, dan ekstensi oleh enzim DNA polimerase. Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung 5' menuju ujung 3' untai DNA target dan mengamplifikasi untuk urutan yang diinginkan.

a. Denaturasi, merupakan proses memisahkan DNA menjadi utas tunggal (Rohmy, 2001). Pada tahap ini molekul DNA dipanaskan sampai suhu 94°C yang menyebabkan terjadinya pemisahan untai ganda DNA menjadi untai DNA tunggal. Untai DNA tunggal inilah yang menjadi cetakan bagi untai DNA baru yang akan dibuat.

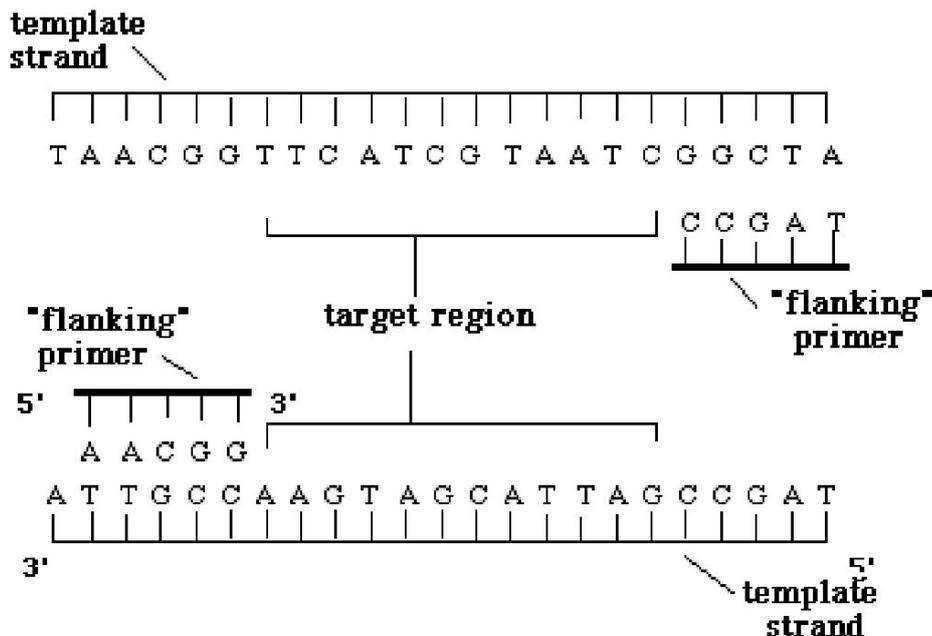


Gambar 6: Untai DNA pada saat mengalami denaturasi (Innis M.,dkk. 1990 dalam kusuma, 2010)

b. *Annealing*, merupakan proses penempelan primer. Enzim *Taq* polimerase dapat memulai pembentukan suatu untai DNA baru jika ada seuntai DNA

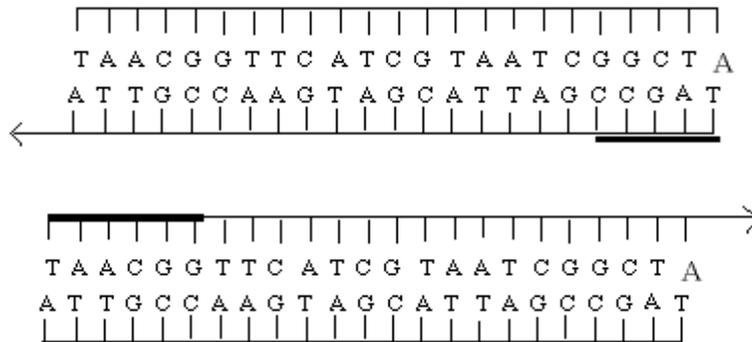
berukuran pendek (DNA yang mempunyai panjang sekitar 10 sampai 30 pasang basa) yang menempel pada untai DNA target yang telah terpisah. DNA yang pendek ini disebut primer (Kusuma, 2010).

Menurut Rohmy (2001), faktor yang mempengaruhi tahap ini antara lain suhu annealing dan primer. Suhu annealing yang terlalu rendah dapat mengakibatkan timbulnya pita elektroforesis yang tidak spesifik, sedangkan suhu yang tinggi dapat meningkatkan kespesifikan amplifikasi. Kenaikan suhu setelah tahap annealing hingga mencapai 70–74 °C bertujuan untuk mengaktifkan enzim *Taq* DNA polimerase. Proses pemanjangan primer (tahap extension) biasanya dilakukan pada suhu 72 °C, yaitu suhu optimal untuk *Taq* DNA polimerase. Selain itu, pada masa peralihan suhu dari suhu annealing ke suhu extension sampai 70 °C juga menyebabkan terputusnya ikatan-ikatan tidak spesifik antara DNA cetakan dengan primer karena ikatan ini bersifat lemah. Selain suhu, semakin lama waktu ekstensi maka jumlah DNA yang tidak spesifik semakin banyak.



Gambar 7: Penempelan primer dengan untai DNA yang telah terdenaturasi (Innis M., dkk., 1990 dalam Kusuma 2010)

c. Pemanjangan (*Ektension*), merupakan proses pemanjangan DNA. Setelah primer menempel pada untai DNA target, enzim DNA polymerase akan memanjangkan sekaligus membentuk DNA yang baru dari gabungan antara primer, DNA cetakan dan nukleotida.



Gambar 8: Perpanjangan DNA secara semi-konservatif (Innis M., *dkk.*, 1990 dalam Kusuma 2010)

Reaksi ini akan berubah dari satu siklus ke siklus selanjutnya mengikuti perubahan konsentrasi DNA. Hasil sintesa DNA dalam satu siklus dapat berperan sebagai cetakan (*template*) pada siklus berikutnya sehingga jumlah DNA target menjadi berlipat dua pada setiap akhir siklus. Dengan kata lain DNA target meningkat secara eksponensial, sehingga setelah 30 siklus akan menjadi milyaran amplifikasi DNA target. Selanjutnya, DNA virus yang telah berlipat ganda jumlahnya dapat dideteksi dengan elektroforesis sel agarosaa.

Komponen-Komponen untuk Reaksi PCR

- a. DNA cetakan / DNA target. Merupakan keseluruhan DNA sampel yang di dalamnya terkandung fragmen DNA target.
- b. Primer. Primer adalah suatu oligonukleotida yang memiliki 10 sampai 40 pb (pb = pasangan basa) dan merupakan komplementer dari DNA target. Pemilihan primer yang tidak sesuai dapat menyebabkan tidak terjadinya reaksi polimerasi antara gen target dengan primer. Pemilihan primer antara lain :

- 1) Panjang primer :15-30 pb. 2) Kandungan GC sekitar 50%. 3) Temperatur penempelan kedua primer tidak jauh berbeda. 4) Urutan nukleotida yang sama harus dihindari. 5) Tidak boleh terjadi *self dimmer*, *pair dimmer*, atau *hairpin*.
- c. DNA Polimerase, merupakan enzim yang stabil dalam pemanasan dan umumnya digunakan enzim *Taq* DNA polimerase (*Taq = Thermus aquaticus*). Enzim ini tetap stabil mengamplifikasi DNA walaupun amplifikasi berjalan pada suhu mendekati titik didih air.
- d. *Buffer* / Dapar. *Buffer* atau dapar yang digunakan umumnya mengandung $MgCl_2$ yang mempengaruhi stabilitas dan kerja enzim polimerase.
- e. dNTPS atau *deoxynukleotide Triphosphates* merupakan suatu nukleotida bebas yang berperan dalam perpanjangan primer melalui pembentukan pasangan basa dengan nukleotida dari DNA target (Innis M. and Gelfand D. dalam Kusuma, 2010)

Elektroforesis

Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran. Maka elektroforesis dapat digunakan untuk separasi makromolekul (seperti protein dan asam nukleat). Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer. Elektroforesis untuk makromolekul memerlukan *matriks* penyangga untuk mencegah terjadinya difusi karena timbulnya panas dari arus listrik yang digunakan (Pratiwi, 2001).

Beberapa faktor mempengaruhi kecepatan migrasi dari molekul protein yakni (Sudarmadji, 1996) :

1. Ukuran molekul protein (Migrasi molekul protein berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil).
2. Konsentrasi gel (Migrasi molekul protein pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat daripada migrasi molekul protein yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi).
3. *Buffer* (penyangga) dapat berperan sebagai penstabil medium pendukung dan dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion sebagai pembawa protein yang bermuatan. Kekuatan ion yang tinggi dalam *buffer* akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik menjadi maksimal. Hal ini dapat mempercepat gerakan molekul protein. Kekuatan ion rendah dalam *buffer* akan menurunkan panas sehingga aliran listrik akan sangat minimal dan migrasi molekul protein sangat lambat.
4. Medium penyangga. Medium pendukung ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia *inert* yang bersifat relatif stabil, mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik, sebagai migrasi elektron atau penyaringan berdasarkan ukuran molekul seperti gel poliakrilamid (Sudarmadji, 1996). Jika ukuran pori dari medium kira-kira sama dengan molekul, maka molekul yang lebih kecil akan berpindah lebih bebas di dalam medan listrik, sedangkan molekul yang lebih besar akan dibatasi dalam migrasinya. Besarnya pori-pori dapat diatur dengan mengubah konsentrasi penyusun gel poliakrilamidnya yaitu akrilamid dan bisakrilamid.
5. Kekuatan voltase. Apabila voltase yang dipakai rendah (100-500) V maka kecepatan migrasi molekul sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan. Sedangkan Voltase yang dipakai tinggi (500-10000) V, mobilitas molekul meningkat secara lebih tajam dan digunakan untuk memisahkan senyawa dengan BM rendah serta jenis arus yang dipakai selalu harus searah (bukan bolak-balik).

6. Temperatur medium disaat proses elektroforesis berlangsung. Jika temperatur tinggi akan mempercepat proses bermigrasinya protein dan sebaliknya jika temperatur rendah akan mengurangi kekuatan bermigrasinya protein.

Molekul DNA mempunyai muatan listrik negatif, sehingga bila ditempatkan pada medan listrik akan bermigrasi menuju kutub positif. Tetapi kebanyakan molekul DNA mempunyai bentuk dan muatan listrik yang hampir sama sehingga fragmen-fragmen dengan ukuran yang berbeda tidak terpisahkan oleh elektroforesis biasa tetapi ukuran molekul DNA merupakan suatu faktor pemisahan jika elektroforesis dikerjakan dalam suatu gel. Gel yang dibuat dari agarosa, *poliakrilamid* atau campuran keduanya akan membentuk kerangka pori-pori yang kompleks untuk dilewati molekul DNA menuju elektroda positif. Makin kecil molekul DNA makin cepat migrasinya melewati gel, sehingga molekul DNA akan terpisah berdasarkan ukurannya. Gel agarosa dan poliakrilamid dapat dibuat dengan berbagai bentuk, ukuran, porositas serta dijalankan dalam berbagai konfigurasi. Kemampuan pemisahan gel agarosa lebih rendah dibanding gel poliakrilamid tetapi penanganannya lebih mudah. Selain itu DNA yang berukuran sekitar 2 pb sampai 50 kb dapat dipisahkan dalam berbagai konsentrasi gel agarosa.

Pencegahan Penyakit Pada Udang

Vaksinasi Udang

Ide vaksinasi udang atau umumnya invertebrata, pada awalnya dinilai tidak mungkin dilakukan karena invertebrata dianggap tidak memiliki respon imun yang adaptif dan hanya mengandalkan respon imun bawaan (Kimbrell & Beutler, 2001). Soderhill dan Thormqvist (1997) menyatakan bahwa vaksinasi akan memberikan hasil yang terbaik bila mampu meningkatkan imunitas selama periode tertentu. Walaupun respon imun adaptif udang masih belum jelas,

namun beberapa hasil penelitian menyimpulkan bahwa vaksinasi dapat digunakan untuk melawan penyakit yang disebabkan oleh bakteri (alabi *dkk.*, 1999) dan virus (Venegas *dkk.*, 2000; Wu *dkk.*, 2002; Wittevelde *dkk.*, 2004).

Imunisasi pada udang adalah suatu usaha untuk meningkatkan ketahanan tubuh udang dengan jalan memasukkan antigen ke dalam tubuh, dan selanjutnya juga dikenal dengan vaksinasi (Anderson, 1995). Vaksin merupakan produk yang dihasilkan dari suspensi mikroorganisme hidup maupun mati yang dapat menghasilkan kekebalan (Ellis, 1988). Dalam tubuh udang, vaksin akan merangsang haemosit untuk melakukan degranulasi dan protein akan dilepaskan seperti ikatan molekul vaksinasi juga dapat meningkatkan jumlah *granulosit*.

Taslihan (1991) mengatakan bahwa terdapat penyebaran *haemosit* pada hepatopankreas pasca larva udang windu setelah dilakukan imunisasi. Itami *dkk.*, (1996) juga mengemukakan bahwa pemberian vaksin (vaksinasi) dapat mencegah infeksi penyakit, karena bisa meningkatkan aktifitas fagosit haemosit dan proPO.

Beberapa penelitian vaksinasi udang menggunakan agen WSSV sebagai sumber vaksin baru-baru ini telah menunjukkan kemajuan dan memperoleh hasil yang menggembirakan. Penelitian sebelumnya telah ditemukan anti-VP24 IgG yang berasal dari struktural protein permukaan VP24 WSSV, yang dimana dapat dijadikan vaksin sebagai pencegah terjadinya penyakit yang disebabkan oleh *White spot syndrome virus* (WSSV) pada udang windu. Dibuktikan pada penyuntikan lobster dengan menggunakan anti-VP24 IgG WSSV yang terlebih dahulu diinkubasi menunjukkan pencegahan awal kematian setelah terjangkit WSSV. Hal ini disebabkan karena senyawa yang disuntikkan di lobster dapat merangsang sistem *hostdefence* tersebut. Infeksi yang disebabkan WSSV benar-benar ditanggihkan atau dinetralkan oleh VP24.

Immunostimulan

Immunostimulan merupakan suatu bahan atau produk yang dapat diberikan melalui pakan untuk tujuan meningkatkan daya tahan tubuh ikan/non ikan terutama pertahanan seluler. Immunostimulan biasanya diidentifikasi melalui kemampuannya untuk mengaktifkan sel darah putih pada percobaan di *test tube*. Ini penting untuk dapat perhatian, karena beberapa eksperimen memberikan sedikit informasi berkaitan efek pemberian immunostimulan pada organisme. Percobaan dengan hewan hidup perlu dilakukan untuk mengetahui efek dari pemberian immunostimulan. Pada udang diketahui ada 2 senyawa/bahan mikroba yg terlibat dalam menstimulasi fungsi seluler yaitu LPS *lipopolysaccharides* dan β -*glucan* dari bakteri dan miselia jamur (Krestin, Lentinan, Schizophyllan, Scleroglucan, SSG, VitaStim) (Mahasri, 2005).

Dinding sel bakteri (LPS, *lipopeptida*, *peptidoglycan* dan *muramylpeptida*) sangat potensial ketika di uji secara *in vitro*. LPS menyebabkan produksi molekul-molekul signal (cytokin) yang mengakibatkan penurunan selera makan dan menekan pertumbuhan hewan. Lebih jauh lagi dinding sel bakteri memiliki struktur kimia yang tidak dapat didefinisikan secara tepat struktur kimianya dan *mode action* sistem imunnya tidak spesifik dan masih tidak jelas (Mahasri, 2005).

β -1,3-*glucan* ditemukan pada miselia jamur dan yeast, berbeda immunostimulannya daripada struktur kimia bakteri dan *mode actionnya*. *Glucan* dapat didefinisikan akurat susunan kimianya dan *mode action*-nya pada sistem imun sangat spesifik dan detail baik pada tingkat seluler maupun molekul. β 1,3-*glucan* dapat meningkatkan kesehatan, pertumbuhan dan performance dari beberapa kelompok hewan yang berbeda seperti : udang, ikan dan hewan darat. β -1,3-*glucan* juga aktif diberikan pada pakan yaitu aplikasi yang nyata dari beberapa produk pakan hewan dan kesehatan sebaik pada manusia dan obat-obatan hewan (Mahasri, 2005).