

Pengklonan dan pengurutan gen penyandi protein permukaan VP19 WSSV isolat Situbondo

Cloning and sequencing of VP19-encoding gene of white spot syndrome virus from Situbondo's isolate

Sahrul Alim¹, Dinamella Wahjuningrum*¹, Muhamad Ali²

¹ *Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor 16680*

² *Fakultas Peternakan, Universitas Mataram
Jl. Majapahit No. 62 Mataram 83125*

**email: dinamella@yahoo.com*

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is the most dangerous shrimp pathogen and give a very bad impact to the shrimp industry in many countries, including Indonesia. Furthermore, the vaccine usage is less effective since the local WSSV suspected to have some mutation and have differences in sequence from the one that used for recombinant vaccine production so far. Therefore, it is necessary to produce recombinant vaccine for immunization of local shrimp according to WSSV isolates from Indonesia. Viral protein 19 (VP19) is an important WSSV envelope proteins because of its involvement in the systemic infection of shrimp, so it can be developed as a recombinant vaccine. The objectives of this study are to obtain VP19-encoding gene of WSSV from Situbondo, Indonesia. This research conducted through several stages, DNA genome isolation of *Penaeus monodon* infected with WSSV, amplification of VP19-encoding gene, isolation of VP19-encoding gene, ligation of VP19-encoding gene into pGEM-T Easy vector, transformation to *Escherichia coli*, recombinant vector screening, vector isolation using mini preparation technique, vector verification, and sequencing. The result of cloning shows that the size of VP19-encoding gene from Situbondo isolates is similar to VP19-encoding gene from the abroad one, which is 366 bp. However, the sequence result shows that there are some differences on bases and amino acid. However, the result of sequencing shows there are difference of five base and three amino acid arranged VP19 sequence the Situbondo isolate with isolate from several countries. The similiarity of the Situbondo isolate sequence with the other isolate (from Indonesian and other countries) was only 98%. This difference indicates the importance of making a vaccine from a local WSSV genes especially Situbondo isolate.

Keywords: white spot syndrome virus, VP19, *Penaeus monodon*

ABSTRAK

White spot syndrome virus (WSSV) merupakan patogen yang paling serius menyerang udang windu dan telah menghancurkan industri udang windu di berbagai negara, termasuk di Indonesia. Penggunaan vaksin WSSV yang didesain berdasarkan isolat WSSV luar negeri kurang efektif karena diduga WSSV yang menyerang udang Indonesia telah mengalami mutasi dan memiliki perbedaan sekuen. Untuk itu, penggunaan isolat WSSV asal Indonesia, khususnya Situbondo sebagai cetakan dalam memproduksi vaksin rekombinan untuk imunisasi udang di Indonesia sangat perlu dilakukan. Viral protein-19 (VP19) merupakan protein pembungkus WSSV yang penting karena keterlibatannya dalam infeksi sistemik pada udang, sehingga dapat dikembangkan sebagai vaksin rekombinan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gen penyandi protein permukaan VP19 virus WSSV isolat Situbondo. Tahapan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah isolasi DNA genom udang windu yang terinfeksi WSSV, amplifikasi gen penyandi protein VP19, isolasi gen penyandi protein VP19, ligasi gen penyandi protein VP19 ke dalam plasmid pGEM-T Easy, transformasi plasmid, skrining plasmid rekombinan, isolasi plasmid dengan teknik *mini preparation*, verifikasi plasmid dan pengurutan. Hasil pengklonan menunjukkan bahwa ukuran gen penyandi protein VP19 isolat Situbondo sama dengan ukuran gen penyandi protein VP19 isolat asing yaitu 366 pb. Namun hasil pengurutan menunjukkan adanya perbedaan lima basa dan tiga asam amino penyusun sekuen VP19 isolat Situbondo dengan isolat dari beberapa negara lain. Kemiripan sekuen isolat Situbondo dengan isolat lain (dari Indonesia sendiri maupun dari negara-negara lain) hanya sebesar 98%. Adanya perbedaan ini mengindikasikan pentingnya pembuatan vaksin dari gen WSSV lokal khususnya isolat Situbondo.

Kata kunci: *white spot syndrome virus*, VP19, *Penaeus monodon*

PENDAHULUAN

Penyakit bintik putih atau bercak putih mulai mewabah di Indonesia sejak tahun 1995, dan dapat menyebabkan kematian 100% udang peliharaan dalam waktu tiga sampai sepuluh hari sejak gejala klinis muncul (Alifudin *et al.*, 2003). Akibat serangan WSSV pada udang windu di Jawa Tengah (Demak, Jepara, Pati, dan Rembang), luas total lahan tambak yang dioperasikan 15 tahun lalu sekitar 7.500 Ha, kini hanya tinggal kurang dari 100 Ha yang masih digunakan untuk budidaya udang (Sup, 2008). Hal ini tentu memengaruhi perekonomian masyarakat pembudidaya udang dan penerimaan devisa negara dari hasil ekspor komoditas udang windu. Penurunan volume ekspor udang Indonesia pada periode 2006–2007 telah diikuti oleh penurunan pendapatan hasil ekspor sebesar 7,7% (nilai sekitar 86 juta USD) dan sangat kontras dengan data nilai ekspor pada periode tahun sebelumnya (2005–2006) yang mengalami kenaikan secara signifikan sebesar 17,7% (nilai sekitar 167,8 juta USD) (DKP, 2008). Adanya serangan WSSV pada udang windu di berbagai daerah produsen udang di Indonesia yang telah mengakibatkan gagal panen.

Menurut Lotz (1997) sejauh ini belum ada spesies udang penaeid yang diketahui resisten terhadap infeksi WSSV. Oleh karenanya, penggunaan vaksin spesifik WSSV merupakan strategi lain untuk mendapatkan udang penaeid sebagai induk maupun bibit udang yang tahan terhadap serangan WSSV. Berbagai upaya dan penelitian untuk meningkatkan immunitas udang terhadap serangan patogen telah berhasil dilakukan seperti penggunaan vaksin berupa polisakarida bersulfat yang diisolasi dari *Sargassum polycystum* (Chotigeat *et al.*, 2004), bakteri *Vibrio* sp. inaktif serta WSSV yang dilemahkan dengan formalin (Namikoshi *et al.*, 2004). Hasil penelitian terbaru dilaporkan oleh Witteveldt *et al.* (2004) yaitu berhasil membuat vaksin rekombinan *viral protein-19* (VP19) yang mampu meningkatkan persentase kelangsungan hidup relatif udang windu

Penaeus monodon sebesar 77%.

VP19 adalah salah satu dari lima protein struktural mayor yang dinamai menurut ukurannya di dalam SDS-PAGE yaitu VP28, VP26, VP24, VP19, dan VP15 (Zuidema *et al.*, 2004). VP19 dan VP28 berlokasi di pembungkus virion (*envelope*), sedangkan VP26, VP24, dan VP15 merupakan protein-protein nukleokapsid (van Hulten *et al.*, 2002). Disamping protein-protein yang disebutkan di atas, masih banyak protein-protein struktural WSSV lainnya yang masih belum diidentifikasi (Lo *et al.*, 2004). VP19 merupakan protein pembungkus WSSV yang penting karena keterlibatannya dalam infeksi sistemik pada udang (Nadala *et al.*, 1998; van Hulten., 2001b; Zhang *et al.*, 2002). Vaksin WSSV luar negeri telah banyak diproduksi, namun di Indonesia vaksin tersebut sulit diperoleh, berharga mahal, ketersediaannya sangat terbatas dan tidak berkesinambungan. Selain itu penggunaan vaksin WSSV yang didesain berdasarkan isolat WSSV luar negeri diduga kurang efektif untuk vaksinasi udang Indonesia, sebab ada kemungkinan bahwa isolat WSSV yang menyerang udang Indonesia telah mengalami mutasi dan memiliki perbedaan sekuen dengan WSSV isolat luar negeri yang menjadi cetakan vaksin rekombinan selama ini. Telah diketahui bahwa beberapa isolat WSSV memiliki ukuran genom total yang berbeda menurut penyebaran geografisnya. WSSV isolat Cina (WSSV-Ch) berukuran sekitar 305 kb (Yang *et al.*, 2001), lebih besar dibanding dengan ukuran genom WSSV dari Thailand (WSSV-Th) yaitu sekitar 293 kb (van Hulten *et al.*, 2001a). Ukuran genom total WSSV terbesar yang pernah disekuensi hingga sekarang adalah genom WSSV dari Taiwan (WSSV-Tw) yaitu sekitar 307 kb (Chen *et al.*, 2002). Perbedaan ukuran genom ketiga isolat ini menandakan bahwa terdapat peluang terjadinya mutasi baik disebabkan oleh delesi ataupun adanya insersi dalam ukuran tertentu pada genom WSSV (Yang *et al.*, 2001). Mutasi juga dapat terjadi oleh kesalahan baca DNA polimerase walaupun peluangnya sangat kecil (Chen *et al.*, 2002a). Oleh karena adanya peluang mutasi, maka penggunaan isolat WSSV asal Indonesia

sebagai cetakan dalam memproduksi vaksin rekombinan untuk imunisasi udang di Indonesia sangat perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gen penyandi protein permukaan VP19 virus WSSV isolat lokal (Situbondo) yang sangat diperlukan untuk menghasilkan vaksin yang bermanfaat dalam pencegahan penyakit WSSV pada udang windu serta mengetahui teknologi molekuler terkait pengklonan gen penyandi protein tertentu dari virus WSS penyebab penyakit yang umum menyerang udang windu.

BAHAN DAN METODE

Isolasi genom udang windu yang terinfeksi WSSV

Sebanyak 0,5 g jaringan udang windu dari udang windu yang terinfeksi WSSV digerus halus dan dimasukkan ke dalam 1,5 mL tabung mikro yang mengandung 500 μ L buffer TE (10 mM Tris.HCL; 1 mM EDTA dan 0,1 M NaCl). Larutan sampel divorteks dan ditambahkan 20 μ L proteinase K (10 mg/mL) dan 50 μ L SDS 10%. Sampel kembali divorteks dan diinkubasi pada penangas air kocok (suhu 65°C) selama satu jam kemudian ditambahkan 50 μ L phenol-kloroform-isoamil alkohol. Larutan dicampur secara perlahan pada temperatur ruang selama 1,5 jam kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama lima menit. Cairan bening bagian atas dipindahkan ke tabung yang baru, kemudian ditambahkan 50 μ L NaCl 5 M dan 1 mL ethanol absolut (100% EtOH), dikocok dengan tangan kemudian diinkubasi pada suhu -80 °C selama 20 menit yang dilanjutkan dengan sentrifugasi 14.000 rpm selama sepuluh menit. Cairan dibuang kemudian endapan ditambah dengan 100 μ L EtOH 75% dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama sepuluh menit. Endapan ditiriskan dan dikeringkan di dalam wadah vakum selama 15 menit. Endapan ditambah 50 μ L buffer Tris-EDTA serta 5 μ L RNase (10 mg/mL), divorteks dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama tiga jam. Larutan ditambah 200 μ L air steril, 400 μ L phenol-kloroform-isoamil alkohol, digoyang secara perlahan dengan tangan dan disentrifugasi

pada kecepatan 8.000 rpm selama sepuluh menit. Cairan bening bagian atas dipindahkan ke tabung baru, ditambahkan 25 μ L NaCl 5 M serta 500 μ L ethanol absolut dingin, dikocok dengan tangan kemudian diinkubasi pada suhu -80 °C selama 20 menit yang dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama sepuluh menit. Supernatan dibuang dan dikeringkan. Endapan yang diperoleh kemudian ditambahkan 20 μ L buffer TE dan disimpan pada suhu -20 °C (Sulandari & Zein, 2003 dalam Mukhlis, 2010).

Amplifikasi gen penyandi protein VP19 dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*)

Susunan primer yang digunakan untuk amplifikasi gen penyandi protein VP19 WSSV adalah sebagai berikut: VP19-F=5'-CGG GAT CCA TGG CCA CCA CGA CTA A-3' dan VP19-R = 5'-GCC TGC AGC CTG ATG TTG TGT TTC TAT A-3' (Ali, 2009). Primer ini disusun dengan mengacu kepada gen penyandi protein VP19 (BankGene: ID: AF369029). Reaksi amplifikasi untuk masing-masing pasangan primer dilakukan dalam volume total 10 μ L dengan komposisi: 0,5 U enzim Ex *Taq* DNA polimerase dengan bufernya (Takara Bio Inc., Otsu, Japan); 0,2 μ M primer; 0,2 mM dNTP mix; 10 ng DNA templat dan air steril. Reaksi amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang diulang secara otomatis. Pre-denaturasi 94 °C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 52 °C selama 30 detik, ekstension pada suhu 72 °C selama 50 detik dengan siklus sebanyak 30 siklus yang dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 72 °C selama tiga menit yang diakhiri pada suhu 4 °C. Hasil PCR akan dielektroforesis menggunakan gel elektroforesis dengan kepadatan agar 2%. Agarosa ditimbang dan ditambahkan TAE 1 \times sebanyak 25 mL, kemudian dipanaskan dalam microwave selama sepuluh menit dan dibiarkan beberapa saat hingga larutan hangat. Setelah itu ditambahkan ethidium bromide (EtBr) sebanyak 2 μ L, kemudian dimasukkan dalam cetakan. Proses elektroforesis menggunakan marker sebagai penanda ukuran dari VP19 sebanyak 4 μ L,

loading dye sebanyak 1 μL dan PCR produk sebanyak 4 μL . Elektroforesis dijalankan dengan *power supply* bertegangan 125 Volt dan kecepatan arus 30 mA selama ± 45 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat dengan meletakkan gel tersebut di atas sinar UV.

Isolasi fragmen gen penyandi VP19 pada gel agarosa

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan produk PCR yang murni (DNA VP19). Gel hasil elektroforesis dipotong tepat pada pita gen VP19 hasil produk PCR. Dari tiga sampel yang digunakan semuanya menunjukkan hasil yang sama pada gel agarosa hasil elektroforesis. Pemotongan gel elektroforesis menggunakan kaca mata pelindung UV dan dilakukan dibalik layar penutup UV. Kemudian hasil pemotongan dicacah dan dihaluskan. Setelah halus, hasil cacahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung untuk ekstraksi DNA (DNA Gel Extraction Kit, Montage, Bedford, MA) dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama sepuluh menit, kemudian diambil cairan atau supernatannya.

DNA yang terdapat pada tabung dipadatkan dengan teknik *ethanol precipitation*. Hasil isolasi ditambahkan CH_3COONa 3M sebanyak $1/10 \times$ jumlah sampel dan *blue dextran* sebanyak 2,5 μL . Setelah itu dilakukan penambahan ethanol 100% sebanyak 2,5 $\mu\text{L} \times$ jumlah sampel dan di simpan pada suhu -80°C selama 10–15 menit kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama lima menit atau sampai cair. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 100 μL ethanol 70% ditambahkan untuk kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Supernatan (ethanol) dibuang dan dilanjutkan dengan pengeringan selama 30 menit menggunakan *vacuum pump*. Pellet DNA tersebut ditambahkan TE Buffer sebanyak 10 μL dan disimpan pada suhu -20°C .

Ligasi gen penyandi protein VP19 dengan plasmid *pGEM-T Easy*

Reaksi ligasi dilakukan dengan mencampur 1 μL vektor *pGEM-Teasy* (25 ng/ μL), 0,5 μL *insert* yang dihitung menurut

Ali (2009) dan 1,5 μL T4 DNA Ligase (Fermentas). Campuran reaksi diinkubasi semalam pada suhu 12°C untuk kemudian dilakukan transformasi ke bakteri *Escherichia coli* DH5 α .

Transformasi plasmid *pGEM-T Easy*

Transformasi bakteri dilakukan dengan teknik *heat shock* dalam bakteri *E. coli* DH5 α dengan mencampur 5 μL hasil ligasi dengan 100 μL sel kompeten *E. coli* DH5 α dalam tabung mikro dalam kondisi dingin (diletakkan di atas es batu). Kemudian diinkubasi pada suhu 42°C selama 30 detik sebagai perlakuan kejut panas. Campuran tersebut kemudian dipindahkan lagi ke suhu dingin (dalam es batu) selama sepuluh menit. Campuran tersebut dipindah ke tabung polipropilena ukuran 15 mL dan ditambahkan media LB 1 mL. Kemudian inkubasi pada penggoyang (*shaker*) 120 rpm selama satu jam dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama lima menit. Setelah itu cairan yang terdapat di atas tabung (media) dibuang dan disisakan 25 μL untuk kemudian dicampur dengan endapan yang terdapat di dasar tabung. Campuran tersebut kemudian ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung ampisilin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) selama semalam pada suhu 37°C .

Skrining plasmid rekombinan

Skrining terhadap koloni *E. coli* DH5 α yang mengandung plasmid rekombinan (pGEMT-VP19) dilakukan dengan metode *white blue* skrining. Koloni putih yang mengandung *insert* digunakan sebagai templat. Campuran reaksi yang digunakan untuk koloni PCR adalah sebagai berikut: 0,5 U *Ex Taq* dan bufernya; 0,5 mM primer spesifik (F dan R) dan 1 μL sampel (koloni yang telah diencerkan dalam air). Program PCR yang digunakan adalah tiga menit pada 94°C , 30 detik pada suhu 94°C sebanyak 25 siklus, 30 detik pada 55°C , 60 detik pada suhu 72°C , dilanjutkan tujuh menit pada 72°C dan diakhiri pada suhu 4°C . Pita DNA dari hasil elektroforesis dengan ukuran yang sesuai merupakan indikasi bahwa klon yang diamplifikasi mengandung plasmid rekombinan. Koloni yang mengandung plasmid rekombinan dikultur pada media LB

pada suhu 37 °C selama 12 jam dengan goyangan untuk isolasi plasmid rekombinan.

Isolasi plasmid

Isolasi plasmid dilakukan dengan mengkultur koloni bakteri yang positif memiliki gen target (berdasarkan hasil PCR koloni). Koloni bakteri tersebut diinkubasi selama semalam pada suhu 37 °C dengan penangas kocok pada 4 mL media LB cair (mengandung ampisilin 50 µg/mL) dan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama lima menit. Endapan yang terdapat pada tabung ditambahkan larutan 1 (TE) sebanyak 100 µL dan divorteks. Kemudian ditambahkan 200 µL larutan 2 (10% SDS, 2N NaOH dan air (1:1:8)). Pencampuran dilakukan dengan membolak-balik tabung secara perlahan sampai terlihat gumpalan-gumpalan putih. Setelah itu, didudukkan selama tiga menit dan ditambahkan dengan 100 µL larutan tiga (5 molar potasium asetat dan 11,5% asam asetat). Pencampuran dilakukan lagi dengan membolak-balikkan tabung yang dilanjutkan dengan sentrifugasi selama lima menit pada kecepatan 15.000 rpm. Supernatan dipindah ke tabung mikro baru dan ditambahkan 400 µL campuran fenol dan kloroform, untuk kemudian di vorteks. Sentrifugasi dilakukan lagi selama 15 menit pada kecepatan 15.000 rpm. Kemudian supernatan dipindah ke tabung mikro baru dan ditambahkan 100 µL fenol 100% dan disimpan pada suhu -80 °C selama sepuluh menit. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi ulang pada kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang sampai habis untuk kemudian dibilas lagi dengan 100 µL ethanol 75%. Supernatan dibuang, endapan yang diperoleh dikeringkan dengan pompa vakum, kemudian ditambahkan bufer TE.

Instrumentasi pengumpulan data

Sebanyak 5 µL hasil PCR ditambah dengan 1 µL *loading dye* dituangkan ke lubang yang telah dibuat pada gel agarosa. Hasil elektroforesis yang berupa pita DNA difoto di bawah penyinaran sinar UV.

Untuk dapat mengetahui urutan gen yang diperoleh maka dilakukan pengurutan setelah dilakukan amplifikasi dengan kit *Thermo*

sequenaseTM II BigDye terminator ver 3 (Ali *et al.*, 2006). Pengurutan dilakukan di *Laboratory of Molecular Biotechnology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan. Untuk membandingkan urutan nukleotida gen sisipan VP19 digunakan program *align genomeonline* (<http://align.genome.jp/>) sedangkan untuk mengubah urutan nukleotida menjadi urutan asam amino gen sisipan VP19 digunakan program *expasy online* (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>). Pengujian tingkat persentase kemiripan gen sisipan VP19 isolat Situbondo dengan isolat lain dari beberapa negara menggunakan program *ClustalW2online* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi gen penyandi protein VP19 WSSV

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan genom udang yang positif terinfeksi virus WSSV sebagai templat. Gen target dalam hal ini adalah gen penyandi protein VP19 WSSV. Kegiatan amplifikasi terhadap gen target (gen penyandi protein VP19) dengan metode PCR telah berhasil dilakukan dengan beberapa kali optimasi suhu *anealing* mulai dari suhu 56 °C hingga 60 °C. Suhu *anealing* yang optimal yaitu 60 °C selama 30 detik. Pasangan primer VP19-F dan VP19-R secara spesifik mampu mengamplifikasi gen VP19 dari genom udang yang terinfeksi WSSV. Ukuran produk PCR yang diperoleh sekitar 405 pb, yang dapat dikonfirmasi dengan marker *GenRulerTM 50 bp DNA Ladder*, Fermentas (Gambar 1).

Untuk keperluan pengklonan, maka diperlukan produk PCR yang lebih banyak. Untuk keperluan tersebut, amplifikasi dilakukan dalam volume reaksi yang lebih besar, sehingga volume reaksi PCR ditingkatkan menjadi 100 µL dengan menggunakan enzim *Ex-Taq* (Gambar 2). Ukuran produk PCR yang dihasilkan sesuai dengan jumlah basa untuk VP19 yang terdapat di *GenBank* sebesar 405 pb (ID: AF369029; urutan sekuen 289998...290363).

Ukuran gen VP19 sebesar 405 pb masih termasuk primer yang menempel pada ujung *forward* dan ujung *reverse* (Gambar 3). Ukuran tersebut terdiri dari gen VP19 yang berukuran 366 bp ditambah 9 bp primer sebelum *start codon* (ATG) dan 30 bp primer setelah *stop codon* (TAA).

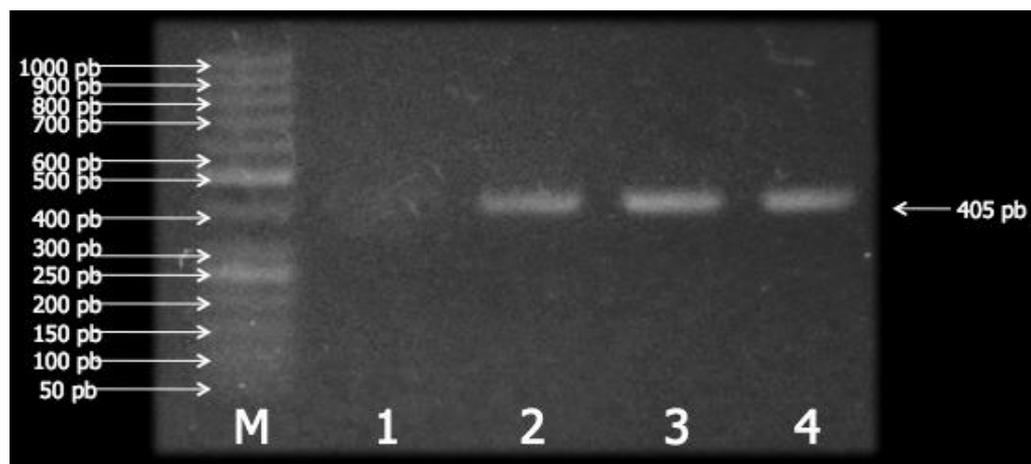
Hasil PCR dielektroforesis, kemudian diisolasi menggunakan DNA gel *extraction kit* (Millipore, Bedford, MA, USA). PCR produk hasil isolasi diencerkan dengan bufer TE dan siap digunakan dalam proses ligasi. Pemurnian ini dilakukan untuk menghindari adanya kontaminan yang berasal dari genom udang itu sendiri, primer yang digunakan dan reagen-reagen lainnya yang dapat mengganggu proses ligasi.

Ligasi vektor *pGEM-T Easy* dengan gen penyandi protein VP19

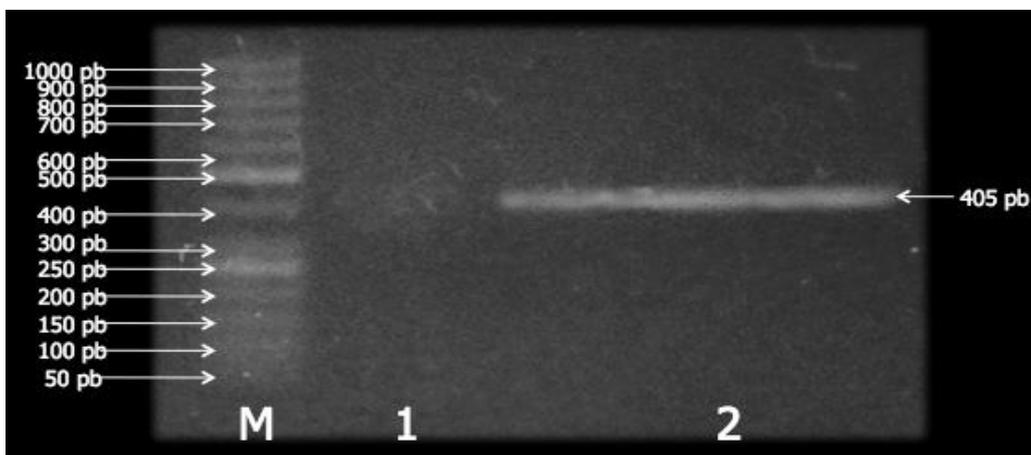
Ligasi gen target (VP19) dengan vektor

pGEM-T Easy (Promega, USA) telah berhasil dilakukan. Vektor *pGEM-T Easy* memiliki sekuen yang menyandikan 146 asam amino penyandi enzim β -galaktopiranosida di wilayah polikloning. Keutuhan ORF (*open reading frame*) gen tersebut akan menyebabkan bakteri pembawa vektor *pGEM-T Easy* mampu memecah media yang mengandung X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktopiranosida) dengan indikator warna biru.

Namun jika ORF gen tersebut terganggu akibat masuknya gen target (VP19), maka enzim β -galaktopiranosida tidak akan dihasilkan sehingga bakteri yang membawa plasmid rekombinan tidak akan mampu memecah media yang mengandung X-gal. Ketidakmampuan tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya koloni berwarna biru, tetapi menjadi warna putih. Kegiatan ligasi antara vektor *pGEM-T Easy* dengan gen



Gambar 1. Hasil elektroforesis gen penyandi VP19 WSSV dengan marker GenRuler™ 50 bp DNA Ladder. Keterangan: M: marker; 1: kontrol menggunakan SW; 2, 3, 4: Gen VP19 dari satu sampel udang yang terserang WSSV.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gen penyandi VP19 WSSV dengan marker GenRuler™ 50 bp DNA Ladder. Keterangan: M: marker, 1: kontrol menggunakan SW; 2: Gen VP19 dengan volume reaksi 100 μ L.

```

cgggatccatggccaccacgactaacactcttcctttcggcaggaccggagcccaggccg
cgggcccttcttacaccatggaagatcttgaaggctccatgtctatggctcgcatcggtc
tctttttgatcgttgctatctcaattgggtatcctcgtcctggccgcatcaatgtatgga
tgggaccaaagaaggacagcgattctgatactgataaggacaccggatgatgatgacgaca
ctgccaacgataacgatgatgaggacaaatataagaacaggaccagggatatgatgcttc
tggtgggtcgcgtcttctgttctcgtttccgccccaccggtttttatgtcttacccca
agaggaggcagtaaaaatatagaaacacaacatcaggctgcaggc

```

Gambar 3. Sekuen gen penyandi VP19 yang berukuran 405 pb.

penyandi protein VP19 dilakukan dengan teknik pengklonan TA. Teknik pengklonan TA merupakan teknik penyambungan vektor dengan gen target yang dibantu oleh enzim *Ex Taq*. Karena pada produk PCR yang didapat menggunakan enzim *Ex Taq*, maka sesuai dengan sifat dari enzim *Ex Taq* yaitu sering menambahkan satu basa “A” pada ujung sekuen produk PCR maka, ujung “A” tersebut akan berkomplemen pada ujung “T” yang terdapat pada vektor *pGEM-T Easy*. Ukuran plasmid *pGEM-T Easy* yang digunakan sekitar 3015 pb yang sudah linier. Plasmid *pGEM-T Easy* ini telah didesain memiliki ujung basa “T” sehingga akan berkomplemen dengan ujung basa “A” yang dihasilkan oleh enzim *Ex Taq* pada ujung sekuen PCR produk. Setelah reaksi ligasi selesai dilakukan, maka plasmid rekombinan siap ditransformasi ke bakteri *E. coli* DH5 α .

Transformasi plasmid rekombinan (pGEMT-VP19) ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α dan skrining koloni pembawa plasmid rekombinan

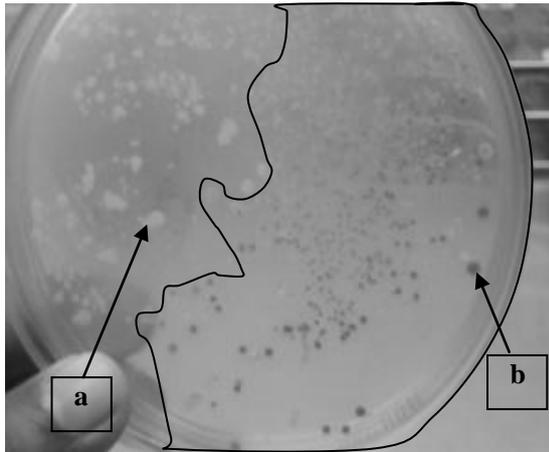
Vektor *pGEM-T Easy* yang telah diligasi dengan produk PCR (gen penyandi protein VP19) menghasilkan plasmid rekombinan (pGEMT-VP19) yang ditransformasikan ke dalam bakteri kompeten *E. coli* DH5 α . Introduksi plasmid rekombinan ke dalam sel bertujuan agar dapat mengalami replikasi (penggandaan). Bertambahnya jumlah vektor rekombinan menyebabkan DNA yang tersisip juga mengalami replikasi. Transformasi plasmid rekombinan ke dalam bakteri dilakukan dengan teknik *heat shock*. Campuran antara hasil ligasi dengan

kompeten sel diinkubasi pada suhu 42 °C selama 30 detik. Adanya kejutan panas tersebut akan menyebabkan kerusakan fisik seperti keretakan dinding sel pada bakteri *E. coli* DH5 α sehingga akan memungkinkan plasmid rekombinan akan masuk ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α tersebut. Untuk merapatkan kembali dinding sel *E. coli* DH5 α yang tadi telah dirusak oleh kejutan panas maka dilakukan pemindahan menuju suhu rendah atau dengan menggunakan es batu selama 10 menit.

Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam tabung ukuran 15 mL dan ditambahkan dengan media LB 1 mL yang dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu ruang dengan shaker selama satu jam untuk tujuan *recovery* bakteri. Setelah itu, biakan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama lima menit. Cairan supernatan dibuang dan hanya disisakan 25 μ L. Bakteri hasil transformasi tersebut selanjutnya ditumbuhkan selama semalam (suhu 37 °C) pada media LB padat yang mengandung ampisilin (50 μ g/mL), IPTG (isopropil tiogalaktosidase) dan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -galaktopiranos). IPTG merupakan bahan untuk menginduksi ekspresi gen penyandi enzim β -galaktosidase (yang terdapat pada sekuen polikloning) yang akan mampu memecah X-gal, sehingga koloni berwarna biru. Sebaliknya, bakteri pembawa plasmid rekombinan tidak mampu memecah X-gal yang diindikasikan oleh munculnya koloni berwarna putih (Gambar 4).

Terjadinya *self ligation* yaitu vektor yang menyambung dengan ujung-ujung vektor itu sendiri (tanpa gen target) tidak dapat

dihindari, sehingga koloni bakteri yang tumbuh akan berwarna biru. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid yang ada tidak tersisipi oleh gen penyandi protein VP19. Sebaliknya, koloni putih memberi arti bahwa gen *lacZ* tidak terekspresikan karena adanya gangguan oleh sisipan yang menyisip ke dalam segmen gen tersebut. Terganggunya ekspresi gen ini menyebabkan gen tersebut tidak mampu mensintesis pembentukan protein (enzim β -galaktosidase).



Gambar 4. Koloni putih (a) dan biru (b) dari bakteri *E. coli* DH5 α pada media LB dengan penambahan ampisilin.

PCR koloni

Koloni bakteri berwarna putih mengindikasikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri rekombinan yang diamplifikasi menggunakan primer spesifik *forward* M13-F=5'-GTC ATA GCT G-3' dan *reverse* M13-R=5'GTT TCC CAG TCA CGA C-3'. Jika dalam plasmid rekombinan tersebut terdapat gen target, maka hasil elektroforesis akan menghasilkan fragmen DNA yang mampu dideteksi dengan penyinaran di bawah UV. Hasil PCR koloni ditampilkan pada (Gambar 5a). Isolasi plasmid telah berhasil dilakukan dengan teknik *mini preparation* (Ali, 2006). Plasmid hasil isolasi tersebut dielektroforesis, dan hasilnya ditampilkan pada (Gambar 5b).

Analisis urutan nukleotida gen sisipan VP19 (pengurutan)

Analisis urutan nukleotida (pengurutan) gen VP19 dari koloni bakteri *E. coli* rekombinan pembawa plasmid pGEM-VP19 telah dilakukan. Hasil pengurutan dengan

menggunakan tiga koloni bakteri menunjukkan ukuran gen target sekitar 366 pb sudah terbaca yang dimulai dengan adanya kodon *start* "ATG" dan diakhiri dengan "TAA" (kodon stop). Urutan basa gen target VP19 ditampilkan pada Gambar 6.

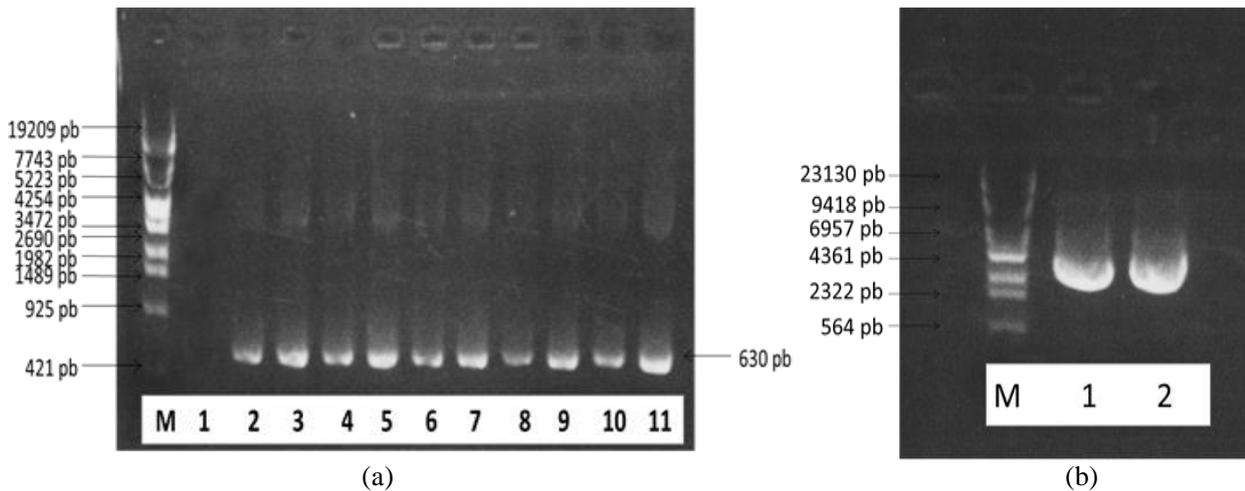
Analisis kesejajaran lokal (BLASTn) dilakukan dengan membandingkan sekuen virus WSS isolat Situbondo dengan sekuen virus WSS dari tempat lain di Indonesia (ID: AY249448); serta dengan sekuen virus WSS dari beberapa negara lain seperti Jepang (ID: AY249447); Korea (ID: AY316119); South Carolina (ID: AY249446); Cina/Qindao (ID: AY249445); dan Cina/Dalian (ID: AY249444); Analisis kesejajaran dilakukan dengan menggunakan program *ClustalW2* (*online*). Hasil analisis menunjukkan bahwa sekuen gen VP19 WSSV isolat Situbondo memiliki sedikit perbedaan dengan sekuen baik dengan virus WSS yang sebelumnya telah berhasil diisolasi di Indonesia maupun dengan sekuen virus WSS dari negara-negara lain. Kemiripan sekuen isolat Situbondo dengan isolat dari Indonesia sendiri maupun dari negara-negara lain sebesar 98% (Gambar 7).

Analisis hasil pensejajaran juga dilakukan pada level asam amino penyusun nukleotida maupun asam amino penyusun protein. Pada level asam amino penyusun nukleotida terdapat lima perbedaan basa yaitu pada urutan sekuen ke 54, 108, 162, 201, dan 218. Isolat Situbondo menunjukkan basa guanina (G) pada urutan sekuen 54 sedangkan isolat lainnya menunjukkan basa timina (T), pada urutan basa sekuen ke 108 isolat Situbondo menunjukkan basa sitosina (C) sedangkan isolat yang lainnya menunjukkan basa guanina (G), pada urutan basa sekuen ke 162 isolat Situbondo menunjukkan basa sitosina (C) sedangkan isolat yang lainnya menunjukkan basa guanina (G), pada urutan basa sekuen ke 201 isolat Situbondo menunjukkan basa timina (T) sedangkan isolat yang lainnya menunjukkan basa sitosina (C), dan pada urutan basa sekuen ke 218 isolat Situbondo menunjukkan basa guanina (G) sedangkan isolat yang lainnya menunjukkan basa timina (T). Kodon adalah deret nukleotida pada mRNA yang terdiri atas kombinasi tiga nukleotida berurutan

yang menyandi suatu asam amino tertentu sehingga sering disebut sebagai kodon triplet (Walker & Rapley, 2002).

Hasil pensejajaran juga dilakukan pada level protein penyusun asam nukleotida. Terdapat tiga perbedaan protein penyusun asam nukleotida pada isolat Situbondo dengan isolat yang masih berasal dari Indonesia sendiri, maupun isolat dari luar

negri. Hasil pensejajaran menunjukkan adanya perbedaan protein pada urutan protein ke 36 yakni, isolat Situbondo menunjukkan isoleusina (I) sedangkan isolat lainnya metionina (M), pada urutan protein ke 54 isolat Situbondo menunjukkan isoleusina (I) sedangkan isolat lainnya metionina (M) dan pada urutan protein ke 73 isolat Situbondo menunjukkan glisina (G) sedangkan isolat



Gambar 5. Hasil PCR koloni yang telah dielektroforesis ukuran 630 pb (a) dan plasmid rekombinan pGEMT-VP19 hasil Isolasi dengan teknik *mini preparation* (b)

```

atg gcc acc acg act aac act ctt cct ttc ggc agg acc gga gcc
cag gcc gcg ggc cct tct tac acc atg gaa gat ctt gaa ggc tcc
atg tct atg gct cgc atc ggt ctc ttt ttg atc gtt gct atc tca
att ggt atc ctc gtc ctg gcc gtc atc aat gta tgg atg gga cca
aag aag gac agc gat tct gat act gat aag gac acc ggt gat gat
gac gac act gcc aac gat aac gat gat gag gac aaa tat aag aac
agg acc agg gat atg atg ctt ctg gct ggg tcc gct ctt ctg ttc
ctc gtt tcc gcc gcc acc gtt ttt atg tct tac ccc aag agg agg
cag taa
    
```

Gambar 6. Sekuen lengkap VP19 isolat Situbondo

| SeqA Name | Len(nt) | SeqB Name | Len(nt) | Score |
|----------------|---------|----------------|---------|-------|
| 1 Situbondo | 366 | 2 Korea | 408 | 98 |
| 1 Situbondo | 366 | 3 Japan | 408 | 98 |
| 1 Situbondo | 366 | 4 Indonesia | 408 | 98 |
| 1 Situbondo | 366 | 5 South | 408 | 98 |
| 1 Situbondo | 366 | 6 China-Qindao | 408 | 98 |
| 1 Situbondo | 366 | 7 China-Dalian | 408 | 98 |
| 2 Korea | 408 | 3 Japan | 408 | 100 |
| 2 Korea | 408 | 4 Indonesia | 408 | 100 |
| 2 Korea | 408 | 5 South | 408 | 100 |
| 2 Korea | 408 | 6 China-Qindao | 408 | 100 |
| 2 Korea | 408 | 7 China-Dalian | 408 | 100 |
| 3 Japan | 408 | 4 Indonesia | 408 | 100 |
| 3 Japan | 408 | 5 South | 408 | 100 |
| 3 Japan | 408 | 6 China-Qindao | 408 | 100 |
| 3 Japan | 408 | 7 China-Dalian | 408 | 100 |
| 4 Indonesia | 408 | 5 South | 408 | 100 |
| 4 Indonesia | 408 | 6 China-Qindao | 408 | 100 |
| 4 Indonesia | 408 | 7 China-Dalian | 408 | 100 |
| 5 South | 408 | 6 China-Qindao | 408 | 100 |
| 5 South | 408 | 7 China-Dalian | 408 | 100 |
| 6 China-Qindao | 408 | 7 China-Dalian | 408 | 100 |

Gambar 7. Hasil Analisis Kemiripan Sekuen Lengkap VP19 Isolat Situbondo

lainnya valina (V).

KESIMPULAN

Hasil pengklonan menunjukkan bahwa ukuran gen penyandi protein VP19 isolat Situbondo sama dengan ukuran gen penyandi protein VP19 isolat asing yaitu 366 pb. Namun hasil pengurutan menunjukkan adanya perbedaan lima basa dan tiga asam amino penyusun sekuen VP19 isolat Situbondo dengan isolat dari beberapa negara lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali M, Hitomi K, Nakano H. 2006. Generation of monoclonal antibodies using simplified single-cell reverse transcription-polymerase chain reaction and cell-free protein synthesis. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 284–287.
- Ali M. 2009. Produksi *antigen* permukaan *virus white spot syndrome* untuk menghasilkan kandidat vaksin rekombinan untuk udang [Laporan Penelitian]. Mataram: Program Intensif Riset Dasar, Universitas Mataram.
- Alifudin M, Dana D, Malole MB, Pasaribu FH. 2003. Patogenesis Infeksi Virus White Spot (WS) pada Udang Windu, *Penaeus monodon*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Chen LL, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, Kou GH. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* 293: 44–53.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A. 2004. Effect of fucosidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 223: 23–30.
- [DKP] Departemen Kelautan dan Perikanan. 2008. Data Potensi, Produksi dan Ekspor/Impor Kelautan dan Perikanan 2007. Jakarta: DKP.
- Lo CF, Wu JL, Chang YS, Wang HC, Tsai JM, Kou GH. 2004. Pathogenesis: Molecular characterization and pathogenicity of white spot syndrome virus. In: Leung KY, (ed). *Molecular Aspects of Fish and Marine Biology Vol. 3: Current Trends in the Study of Bacterial and Viral Fish and Shrimp Diseases*. Singapore: World Scientific Publishing. pp: 155–188.
- Lotz JM. 1997. Viruses, biosecurity, and spesific pathogen free stock in shrimp aquaculture. *World J. Microbial Biotech.* 13: 405–413.
- Mukhlis A. 2010. Pengklonan Gen VP28 penyandi viral protein-28 dari *virus white spot syndrome* sebagai langkah awal produksi vaksin rekombinan udang penaeid [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nadala ECB Jr, Tapay LM, Loh PC. 1998. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid to penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ.* 33: 221–229.
- Namikoshi A, Wu JL, Yamashita T, Nishizawa T, Nishioka, T, Arimoto M, Muroga K. 2004. Vaccination trials with *Panaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229: 25–35.
- Sup. 2008. Teknik “Double Screening” Untuk Udang Windu. *Kompas*. <http://cetak.kompas.com/read/xml/2008/06/10/01353616/teknik.double.screening.untuk.udang.windu>. [7 November 2010].
- Van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, KloosterboerN, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Klein LR, Vlak JM. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7–22.
- Van Hulten MCW, Witteveldt J, Snippe M, Vlak JM. 2001b. White spot syndrome envelope protein VP28 is involved in the systemic infections of shrimp. *Virology*. 285: 228–233.
- Van Hulten MCW, Reijns M, Vermeesch AM, Zandbergen F, Van JM. 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J. Gen. Virol.* 83: 257–265.
- Walker JM, Rapley R. 2002. *Molecular Biology and Biotechnology*. Great Britain:

- Athenaeum Press Ltd, Gateshead, Tyne and Wear.
- Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlak JM, van Hulten MCW. 2004. Protections of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol*. 78: 2057–2061.
- Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, and Xu X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*. 75: 11811–11820.
- Zhang X, Huang C, Xu X, Hew CL. 2002. Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J Gen Virol*. 83: 1069–1074.
- Zuidema D, van Hulten MCW, Marks H, Witteveldt J, Vlak JM. 2004. Platform technologies to study pathogenesis: Virus-host interactions of white spot syndrome virus. *In: Leung KY (ed). Molecular Aspects of Fish and Marine Biology Vol. 3: Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases.* Singapore: World Scientific Publishing. pp. 237–255.