

# KARAKTER PROTEIN ICP11 PADA DNA UDANG VANNAMEI (*Penaeus vannamei*) YANG TERINFEKSI WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

Yuni Kilawati\* dan Win Darmanto\*\*

\* [yuniqla@yahoo.com](mailto:yuniqla@yahoo.com)/[yuniqla@ub.ac.id](mailto:yuniqla@ub.ac.id). Fisheries and Marine Science Faculty, Brawijaya University

\*\* [darmanto@unair.ac.id](mailto:darmanto@unair.ac.id). Saintech Faculty, Airlangga University

## ABSTRACT

The aim of this study was to support policy of government to lessen import and improve export of non migas presented characteristic of genetic of white prawn mains (*Penaeus vannamei*) so that this product can be yielded in Indonesia with high quality which do not fail with import product. Special goals wishing to be reached at this research is to analyze the genetic characteristic DNA with Polymorphism Chain Reaction (PCR) and primer ICP11. The background of this research was difference among vannamei prawn DNA characteristic that have infected by viruses. With experimental methods ten healthy post larva of white prawn cultured in aquarium and invected by WSSV virus in 1ml/10 l marine water dossage with three time replication during 7 days in culture. To know these infection, the sample were analyze with specific primer ICP11.

**Key words:** DNA; ICP11; PCR; white shrimp (*Penaeus vannamei*)

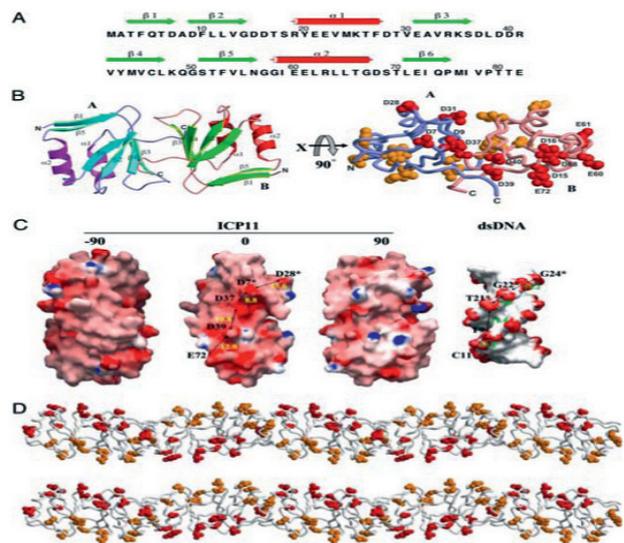
## PENGANTAR

Pemijahan berulang yang dilakukan pada SPF udang vannamei di Indonesia menghasilkan keturunan yang memiliki ketebalan tidak sama, hal ini disebabkan oleh banyak variabel di antaranya asal-usul induk, keturunan beberapa, pemantauan mutu genetik dan lingkungan. Melihat kenyataan ini diduga SPF udang juga memiliki ketahanan yang berbeda terhadap serangan penyakit WSSV. *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) adalah salah satu jenis penyakit yang menyerang spesies udang yang dibudidayakan dan jenis crustacea yang lainnya. Pada tambak udang, virus ini dapat mengakibatkan total kematian 100% pada 2 sampai 10 hari penyerangan (Wang *et al.*, 2007).

Pada sel organ udang yang terserang WSSV, virus ini ditemukan di sitoplasma (Chen *et al.*, 2002). Mekanisme penyerangan WSSV ke tubuh udang awalnya bersifat intrasitoplasmik, yaitu masuk ke dalam sel inang kemudian pada tingkat serangan yang lebih tinggi DNA virus masuk ke dalam DNA inang dan mengambil alih proses transkripsi dan translasi sesuai proses dalam DNA virus.

Replikasi WSSV bisa terjadi pada beberapa bagian sel dengan nukleus sebagai letak utama virus berplikasi (Wang *et al.*, 2000). Akan tetapi pertumbuhan dan kematangan partikel-partikel virus setelah diamati berkali-kali, berada di dalam sitoplasma dari folikel sel (Lo *et al.*, 1997). Pada penelitian yang dilakukan Wang (2004) bahwa hasil dari *imunofluoresen assay* dan *electron microscopy* menunjukkan positif VP28 pada sitoplasma sel yang terinfeksi WSSV,

sinyal positif ini kemungkinan disebabkan tidak hanya oleh protein VP28 bebas tapi juga oleh VP28 yang terdapat pada virion. Hal ini konsisten dengan ide bahwa replikasi dan morfogenesis DNA WSSV kemungkinan terjadi di sitoplasma sel udang yang terinfeksi.



**Gambar 1.** Distribusi muatan negatif ICP11 yang menyerupai bentuk B DNA helik. (A) Elemen struktur sekunder sekuen asam amino: garis bawah hijau dan tabung merah:  $\beta$ -strand dan  $\alpha$ -heliks, (B) Pita dimer ICP11 (kiri) Strands dan heliks monomer A: biru dan merah, (C) Dimer ICP11 dan dsDNA. Kode pewarnaan GRASP, merah - biru: potensial elektrostatik  $-15 k_B T$ , sampai  $+15 k_B T$ , (D) Persebaran muatan negatif asam amino ICP11 (Wang *et al.*, 2008).

Pada level transkripsi dan translasi yang terjadi pada sel inang yang telah terserang virus WSSV terekspresi suatu protein. Protein ini bersifat nonstruktural dan menurut Wang *et al.* (2007). Protein ini dinamakan *ICP11*. Gambaran bentuk *ICP11* sesuai penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.*, 2008 disajikan pada Gambar 1.

*ICP11* adalah protein nonstruktural yang terbanyak diekspresikan oleh gen WSSV, yang mana diduga kuat sangat berperan pada infeksi WSSV, namun sampai sekarang fungsinya diabaikan untuk diamati. Pada penelitian yang dilakukan baru-baru ini oleh Wang *et al.* (2008) menghasilkan *ICP11* berperan seperti sebuah DNA. Dalam kristal *ICP11* dibentuk oleh sebuah polimer dari dimer dengan 2 baris titik yang bermuatan negatif yang diasumsikan adalah susunan duplek dari kelompok fosfat pada DNA. *ICP11* mengikat pada histon protein inang, berfungsi melindungi DNA dari ikatannya terhadap histon protein H2A, H2B, H3 dan H2A.x. Pada *hemocyte* udang yang terinfeksi WSSV, *ICP11* terletak bersama H3 dan diaktifkan oleh H2A.x., untuk lebih jelasnya ditunjukkan pada Gambar 2 berikut ini.

## BAHAN DAN CARA KERJA

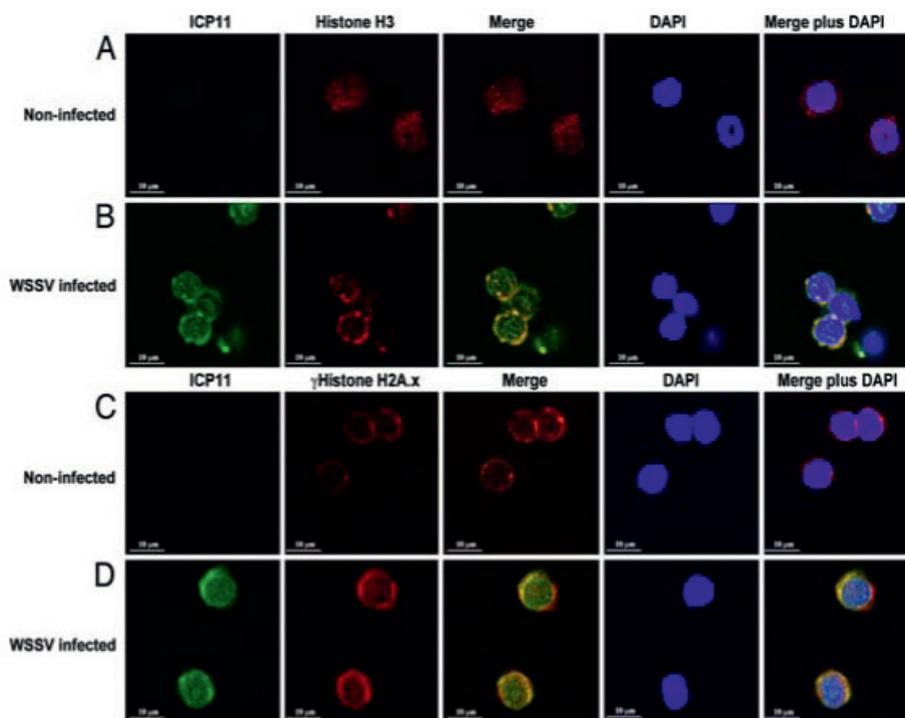
Bahan yang dipakai pada penelitian ini adalah: Stok primer, Aquades, 10× BD *Advantage 2 PCR-Buffer*,

dNTP (10 mM), 50× BD *Advantage<sup>TM</sup>2 polymerase mix*, *Agarose gel*, TAE, ETBR, *Loading buffer*. Peralatan yang dipakai adalah: Mesin PCR, *vortex*, *refrigerator*, *centrifuge*, *microwave*, Elektroforesis.

Sampel udang diuji tantangan dengan isolat WSSV dengan dosis 0,1 ppm pada lingkungan yang terkontrol selama 7 hari. Sampel yang telah diuji tantangan dengan WSSV menghasilkan 3 kelompok yaitu udang rentan terhadap penyakit ditandai dengan kematian dan yang tahan terhadap penyakit atau survive sampai akhir masa pengamatan serta yang tidak diinfeksi WSSV. Ketiga kelompok ini kemudian dianalisis PCR dengan primer spesifik, yaitu *ICP11*. Proses amplifikasi gen *ICP11* udang vannamei Indonesia yang tahan dan yang rentan terhadap WSSV serta yang tidak diinfeksi WSSV, dilakukan dengan cara menambahkan primer ICP11\_F dan ICP11\_R pada masing-masing tabung yang telah berisi sampel, dan dimasukkan dalam thermocycler sebanyak 34 siklus.

## HASIL

Hasil desain primer spesifik untuk mengetahui hasil penginfeksian dalam DNA udang putih disajikan pada Tabel 1.

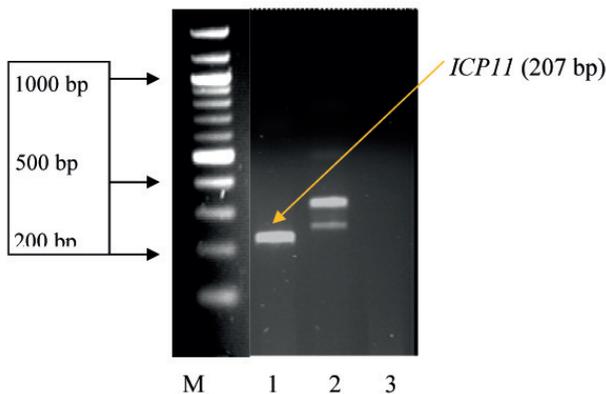


**Gambar 2.** *ICP11* yang terletak pada *histone H3* dan *histone H2A.x in vivo*. Kontrol dan *hemocyte* udang terinfeksi WSSV yang diawetkan dengan paraformaldehid (72 hpi), pewarna untuk *ICP11* (FITC, *green*) dan untuk *histone H3* (A dan B) dengan TRITC (merah) dan  $\gamma$  *histone H2A.x* (C dan D). area hijau menunjukkan letak *histone* protein dan *ICP11* yang terletak pada area yang sama (Wang *et al.*, 2007).

**Tabel 1.** Diskripsi primer *ICP11*

a. <i>ICP11</i> for forward (Wsv230_19F22)	b. <i>ICP11</i> for reverse (Wsv230_202R24)
✓ 5' GAC GCC GAT TTC TTG CTG GTG G 3'	✓ 5' GGG TTG AAT CTC CAG CGT TGA ATC 3'
✓ A=2, G=8, C=5, T=7	✓ A=5, G=7, C=5, T=7
✓ G-C contain 59%	✓ G-C contain 50%
✓ Melting Point 70°C	✓ Melting Point 72°C
✓ Konsentrasi in 1 ml: 62 µM, For 50 molar (50 pmol/ µl) dilution in aquades 1249 µl	✓ Konsentrasi in 1 ml: 45 µM, For 50 molar (50 pmol/ µl) dilution in aquades 891 µl
✓ OD 14.3	✓ OD 11.7

Hasil amplifikasi gen *ICP11* ditunjukkan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Pola pita hasil amplifikasi *ICP11* pada udang vannamei Indonesia yang rentan dan tahan WSSV (M: DNA ladder 100 bp, 1: udang vannamei yang rentan terhadap WSSV, 2: udang vannamei yang tahan terhadap WSSV dan 3: udang yang tidak diinfeksi WSSV)

Pada gambar 3, ditunjukkan bahwa kuantitas *ICP11* dari udang vannamei yang telah diinfeksi WSSV baik yang tahan atau yang rentan cukup baik, karena pola pita dapat dilihat dengan jelas pada gel agarose. Pada jalur 1 adalah sampel udang vannamei yang rentan terhadap WSSV, *ICP11* berhasil diamplifikasi pada 207 bp. Pada jalur 2 sampel

**Tabel 2.** Amplifikasi gen *ICP11* pada udang vannamei Indonesia yang rentan dan tahan WSSV

Sampel/Jalur	Amplifikasi <i>ICP11</i>
R (1)	207 bp
T (2)	300 bp 250 bp
TI (3)	Tidak teramplifikasi

Keterangan: T : sampel yang tahan terhadap serangan WSSV  
R : sampel yang rentan terhadap serangan WSSV  
TI : sampel yang tidak diinfeksi  
Bp : base pairs (pasangan basa)

udang vannamei yang tahan terhadap WSSV, *ICP11* berhasil diamplifikasi pada dua tempat yaitu 300 dengan pita yang lebih jelas dan pada 250 bp dengan pita yang lebih samar. Pada jalur 3 adalah sampel udang yang tidak diinfeksi WSSV, dan tidak terjadi amplifikasi *ICP11*.

Untuk lebih memperjelas rekapitulasi hasil dokumentasi gel elektroforesis dari pola pita yang dihasilkan dari amplifikasi *ICP11* pada udang yang rentan, tahan dan tidak diinfeksi WSSV disajikan pada Tabel 2.

## PEMBAHASAN

Gen *ICP11* dipilih berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.*, (2008), bahwa *ICP11* adalah protein non struktural yang disandi oleh gen *ICP11* yang diduga kuat sangat berperan pada infeksi WSSV.

*ICP11* adalah protein non struktural yang dominan diekspresikan oleh gen WSSV, yang mana diduga kuat sangat berperan pada infeksi WSSV, namun sampai sekarang fungsinya diabaikan untuk diamati. Pada penelitian yang dilakukan baru-baru ini oleh Wang *et al.* (2008), menghasilkan *ICP11* berperan seperti sebuah DNA. Dalam kristal *ICP11* dibentuk oleh sebuah polimer dari dimer dengan 2 baris titik yang bermuatan negatif yang diasumsikan adalah susunan duplek dari kelompok fosfat pada DNA.

Sampel DNA dibagi menjadi 3, yang pertama yaitu udang vannamei yang diuji tangguh dan terinfeksi dengan indikasi perubahan morfologi, tingkah laku dan mengalami kematian, yang kedua adalah yang diuji tangguh WSSV tetap *survive* atau tidak terinfeksi hingga akhir perlakuan dan yang ketiga atau kontrol adalah udang vannamei yang sehat atau tidak diinfeksi WSSV.

Hasil amplifikasi gen *ICP11* antara kelompok sampel 1, kelompok sampel 2 serta kelompok 3, memberikan hasil yang berbeda. Amplifikasi gen *ICP11* pada udang yang rentan terhadap WSSV menghasilkan pita sebesar 207 bp, sedangkan pada udang yang tahan terhadap WSSV adalah sebesar 300 bp dan 250 bp, serta pada udang yang tidak diinfeksi WSSV tidak menghasilkan pita.

Pada kelompok pertama, yaitu udang vannamei yang rentan terhadap serangan WSSV, *ICP11* teramplifikasi dengan kuantitas paling banyak dan pada posisi yang tepat hal ini disebabkan DNA virus yang telah menginsersi secara sempurna pada DNA sel inang sehingga udang tidak mampu bertahan dan menyebabkan kematian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara biologis *ICP11* memiliki peran penting dalam kematian sel yang terserang WSSV, dengan beberapa kemungkinan mekanisme yang terjadi. Mekanisme yang pertama adalah bahwa

*ICP11* langsung menyebabkan gangguan nukleosom, sehingga menyebabkan kematian sel. Kemungkinan lain adalah bahwa *ICP11* dapat menyebabkan kematian sel melalui mekanisme yang tidak langsung, yaitu dengan mengikat *histone* di sitoplasma. *ICP11* dapat mengganggu mekanisme dengan mencegah *histone* terikat ke inti, sehingga terjadi destabilisasi nukleosom, yang memiliki peran sangat penting bagi pengaturan epigenetik ekspresi gen dan konsekuensi adalah terjadinya kematian sel.

Pada kelompok kedua yaitu udang vannamei yang tahan terhadap serangan WSSV, *ICP11* teramplifikasi pada 2 pita dengan kuantitas yang berbeda. Pada 300 bp diperoleh pita dengan kuantitas yang lebih banyak sedangkan pada 250 bp lebih samar. Amplifikasi yang terjadi pada 2 pita ini menunjukkan adanya polimorfisme yang bisa terjadi karena adanya kontrol gen. Kontrol gen pada eukariot dilakukan dengan cara langsung menanggapi perubahan lingkungan dengan proses fisiologis. Apabila terjadi perubahan lingkungan secara ekstrim yang tidak sesuai bagi kebutuhan hidup secara normal organisme tersebut, maka proses fisiologis akan menyesuaikan sebagai hasil kerja dari kontrol gen. Pada kondisi lingkungan yang tidak sesuai dan terjadi terus-menerus akan mengakibatkan perubahan pada level gen sebagai respon dan usaha untuk beradaptasi.

Pada kelompok tiga yaitu kontrol tidak dijumpai pita atau *ICP11* tidak teramplifikasi karena berisi DNA sampel udang yang sehat sedangkan *ICP11* adalah berasal dari gen virus WSSV sehingga bisa dipastikan pada udang vannamei yang tidak diinfeksi WSSV maka tidak terdapat virus WSSV di dalam selnya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa primer *ICP11* dapat dipakai sebagai *marker* untuk mendeteksi ketahanan udang vannamei di Indonesia terhadap serangan WSSV karena memberikan hasil pita yang berbeda antara udang yang tahan dan rentan terhadap infeksi WSSV serta udang yang sehat sebagai kontrol.

Ketebalan atau kuantitas pita yang berbeda, yaitu pada udang yang rentan memiliki ketebalan yang lebih dibandingkan dengan yang tahan menunjukkan bahwa pada udang yang rentan *ICP11* yang terekspresi lebih besar dibandingkan pada udang yang tahan terhadap WSSV. Didukung keterangan Wang, *et al.* (2008), bahwa kelimpahan *ICP11* disel inang menghalangi inti sel protein *histone*, yang mengakibatkan DNA dalam sel inang rentan mengalami kerusakan, dan akhirnya mengarah ke gangguan mesin genetik di dalam nukleus.

Kemunculan jumlah pita yang tidak sama diduga karena proses terjadinya infeksi yang berlangsung dalam sel inang menimbulkan ekspresi yang berbeda pula. Hal ini sering ditemui pada penampakan pita yang dihasilkan oleh beberapa *kit* produksi industri. Pita yang dihasilkan pada *kit* tersebut beragam mulai dari serangan rendah sampai tinggi.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekspresi gen *ICP11* udang vannamei Indonesia yang tahan dan yang rentan terhadap WSSV adalah berbeda, pada udang yang tahan teramplifikasi pada 207 bp sedangkan yang rentan teramplifikasi pada 300 bp dan 250 bp. Primer *ICP11* dapat digunakan sebagai primer spesifik untuk mendeteksi penyakit WSSV pada udang vannamei.

## KEPUSTAKAAN

- Chen LL, Leu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH, Lo CF, dan 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.
- Lo CF, Ho CH, Chen CH, Liu KF, Chiu YL, Yeh PY, *et al.* 1997. Detection and Tissue Tropism of White Spot Syndrome Baculovirus (WSBV) in Captured Brooders of *Penaeus Monodon* with a Special Emphasis on Reproductive Organs. *Dis Aquat Organ* 1997, 30: 53–72.
- Wang Q, Poulous BT and Lightner DV, 2000. Protein Analysis of Geographic Isolates of Shrimp White Spot Syndrome Virus. *Arch Virol*, 145: 263–274.
- Wang Han-Ching, Chang Yun-Shiang, Kou Guang-Hsiung and Lo Chu-Fang, 2004. White Spot Syndrome Virus: Molecular Characterization of a Major Structural Protein in a Baculovirus Expression System and Shrimp Hemocytes. *Mar. Biotechnol* 6: S95–S99.
- Wang HC, Hao-Ching Wang, Guang-Hsiung Kou, Chu-Fang Lo, dan Wei-Pang Huang, 2007. Identification of *Icp11*, The Most Highly Expressed Gene of Shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 74: 179–89.
- Wang, Hao-Ching, Wang Han Ching, Ko Tzu Ping, Lee Yu-May, Leu Jian-Horng, Ho Chun-Han, Huang Wei-Pang, Lo Chu-Fang and Andrew Wang HJ, 2008. White spot syndrome virus protein ICP11: A histone-binding DNA mimic that disrupts nucleosome assembly. *PNAS*, 105(52): 20768–83.

Reviewer: **Prof. Dr. Ir. Hari Soeprapto**