

EVALUASI PEMBERIAN CpG DNA UNTUK MENINGKATKAN EKSPRESI GEN IMUN PADA IKAN KERAPU MACAN (*Epinephelus fuscoguttatus*)

*Evaluation of CpG DNA for Increasing Immune Gene Expression in Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*)*

Ruqayyah Jamaluddin¹, Sunarti¹, Nur Fajriani Nursida², Agus Suryahman¹, Akbar Marzuki Tahya³

¹Akuakultur, Fakultas Perikanan, Universitas Cokroaminoto, Makassar.

²Budidaya Perairan, Stitek Balikdiwa, Makassar.

³Akuakultur, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Tadulako, Palu.

E-mail: ruqayyahjamaluddin4@gmail.com

ABSTRAK

CpG DNA merupakan imunostimulan DNA sintetik yang mengandung CpG motif, terdiri dari sekuen pendek satu atau lebih motif CpG dan berperan sebagai *danger signal* terhadap sistem kekebalan imun natural maupun bawaan. Penelitian bertujuan menganalisa kemampuan CpG DNA untuk meningkatkan ekspresi gen Interleukin 1 β (IL1 β) pada ikan kerapu macan agar dapat dijadikan sebagai imunostimulan. Analisis tingkat ekspresi gen dilakukan dengan cara mengekstrak RNA organ kepala ginjal yang diberi perlakuan CpG DNA dan perlakuan PBS sebagai kontrol. Sintesis DNA komplementer (cDNA) dilakukan menggunakan kit Ready To Go You Prime First Strand Beads (GE Healthcare) dengan teknik RT-PCR. Produk PCR selanjutnya dianalisa dengan UN SCAN IT berdasarkan ketebalan fragmen DNA. Tingkat ekspresi gen serta nilai luminescence photostimulated dari gen IL1 β lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan PBS sebagai kontrol. Nilai luminescence photostimulated gen IL1 β pada perlakuan CpG DNA yaitu 113684 sementara pada perlakuan PBS sebagai kontrol hanya sebesar 95610.

Kata kunci: CpG DNA, *Epinephelus fuscoguttatus*, imunostimulan.

ABSTRACT

CpG DNA is a synthetic DNA immunostimulant with a CpG motif, consisting of a short sequence of one or more CpG motifs. It acts as a danger signal to the natural and innate immune system. This study aimed to analyze the ability of CpG DNA to increase the expression of the Interleukin 1 β (IL1 β) gene in tiger grouper fish so that it can be used as an immunostimulant. The gene expression level was analyzed by extracting RNA from the kidney head, which was treated with CpG DNA and PBS treatment as a control. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using the Ready To Go You Prime First-Strand Beads (GE Healthcare) kit with the RT-PCR technique. The PCR products were then analyzed by UN SCAN IT based on the thickness of the DNA fragments. The level of gene expression and photostimulated luminescence value of the IL1 β gene was higher than the PBS treatment as a control. The photostimulated luminescence value of the IL1 β gene in the CpG DNA treatment was 113684, while the PBS treatment as control was only 95610.

Keywords: CpG DNA, *Epinephelus fuscoguttatus*, immunostimulant.

PENDAHULUAN

Ikan kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus* merupakan salah satu jenis ikan kerapu yang sangat menguntungkan secara ekonomi karena tingginya nilai jual baik di pasar internasional maupun serta pertumbuhannya yang cepat dan dapat diproduksi secara massal (Kani *et al.*, 2012). Namun demikian, para petani sering mengalami beberapa kendala terutama adanya serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, parasit, dan lain-lain. Untuk mengatasi hal tersebut khususnya yang disebabkan oleh mikroorganisme, para pembudidaya menggunakan berbagai jenis antibiotik. Penggunaan antibiotik kemudian menjadi masalah karena dapat menimbulkan bakteri strain baru yang resisten sehingga tidak akan efektif sebagai upaya penanggulangan penyakit (Rantetondok, 2002). Alternatif lain yang dapat dilakukan adalah penerapan vaksin, namun penggunaan vaksin disamping harganya yang mahal juga bersifat spesifik terhadap agen penyakit tertentu. Oleh karena itu diperlukan solusi lain yang dapat membantu meningkatkan kekebalan tubuh terhadap agen penyakit seperti imunostimulan. Penggunaan imunostimulan bisa menjadi solusi yang paling aman sebagai upaya perlindungan terhadap serangan penyakit, karena dapat meningkatkan sistem kekebalan natural (*innate immunity*) dan kekebalan bawaan (*adaptive immunity*) pada ikan (Sakai 1999; Ortuno *et al.*, 2002).

Salah satu jenis imunostimulan yang sangat potensial dan efektif dalam meningkatkan kekebalan tubuh mamalia, ikan dan udang adalah berupa sekuen nukleotida spesifik yang disebut motif *unmethylated cytosine phosphate guanosine* (CpG) (Krieg 2002; Tassakka dan Sakai, 2004; Chen *et al.*, 2007). Motif CpG ditemukan pada DNA bakteri dengan frekuensi yang sangat tinggi dan tidak termetilasi. Sedangkan pada DNA mamalia motif CpG ditemukan dengan frekuensi yang sangat rendah dan termetilasi. Masuknya motif CpG ke dalam tubuh diterima oleh *Reseptor Toll-like* (TLR9). TLR9 ini hanya bisa menerima atau mengenali CpG yang tidak termetilasi sehingga motif CpG yang memungkinkan untuk diaplikasikan adalah yang berasal dari bakteri dan bukan dari mamalia.

Seiring dengan meningkatnya kebutuhan akan CpG yang semakin tinggi, pemenuhan dengan cara konvensional tidak mampu mencukupi kebutuhan. Oleh karena itu, dikembangkan imunostimulan DNA sintetik yang sekuennya menyerupai CpG DNA bakteri yang disebut CpG *oligodeoxynucleotides* atau CpG-ODNs (Tokunaga *et al.*, 1984). *Oligodeoxynucleotide* sintetik ini mengandung CpG motif yang terdiri dari sekuen pendek yang mengandung satu atau lebih motif CpG dan berperan sebagai *danger signal* terhadap sistem imun vertebrata sehingga dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri dengan cara mengaktivasi *Antigen Presenting Cells* (APCs) dan menginduksi respon imun tipe Th1.

CpG-ODNs dapat diklasifikasikan menjadi tiga yaitu tipe D, K, dan C. Masing-masing tipe CpG-ODN tersebut tidak hanya mampu menstimulasi respon imun pada spesifik organisme tetapi juga memungkinkan untuk tipe yang berbeda memberikan stimulasi respon imun pada organisme yang sama. Misalnya sekuen motif "TTCGTT" dapat meningkatkan respon imun pada manusia namun tidak efektif meningkatkan respon imun pada ikan. Sementara CpG-ODN motif "GACGTT", "GTCGTT" atau "AACGTT" memiliki efek kekebalan pada ikan (Jorgensen *et al.* 2001^a). Penelitian Tasakka (2005), menyatakan bahwa motif CpG ODN 1668 dengan sekuen "TCCATGACGTTTCCTGATGCT" termasuk dalam kategori tipe D memiliki efek spesifik terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*). Sementara motif CpG ODN 2006 dengan sekuen "TTCGTCGTTTTGTCGTTTGTCGTT" masuk dalam kategori tipe K spesifik terhadap

udang windu (*Penaeus monodon*) (Handoyo, 2013; Nursida, 2015). Hasil penelitian terbaru mengenai penggunaan CpG ODN ini yang dilakukan oleh Kani *et al.* (2012) adalah pemberian CpG-ODN 1668 (TCCATGACGTTTCCTGATGCT) dan CpG-ODN 2133 (TCGTCGTTGGTTGTCTTTTGGT) mampu memacu peningkatan kekebalan nonspesifik pada benih ikan kerapu macan yang ditunjukkan dengan kenaikan indeks fagositosis dan lisosim pada hari ke tujuh pasca injeksi. Namun demikian, masih diperlukan analisis lebih lanjut secara molekuler untuk mengetahui ekspresi gen-gen apa saja yang kemungkinan berperan dan mampu diaktifkan oleh CpG ODN 2133 pada sistem imun ikan kerapu macan.

Gen sitokin merupakan salah satu gen yang sangat berperan penting dalam sistem imun. Sitokin adalah polipeptida sederhana atau glikoprotein yang bertindak sebagai molekul sinyal dalam sistem kekebalan tubuh. Molekul genetiknya terdiri atas beberapa kelompok yang dikelas sebagai keluarga gen yaitu interleukin, limfokin, faktor pertumbuhan, interferon serta kemokin (Thomson, 1994). Sitokin berperan dalam komunikasi antar sel dan dapat masuk ke dalam sistem sirkulasi dan memberikan efek yang sistemik (bagus) pada sel target secara spesifik (Wibawan dan Soejoedono, 2013). Gen *interleukin 1 β* (IL-1 β), *tumour necrosis factor* (TNF- α 1) serta *cyclooxygenase* (COX-2) merupakan gen imun yang umum diamati untuk melihat tingkat ekspresi sebagai indikator (Tasakka, 2005). *Interleukin 1 β* (IL-1 β) merupakan mediator kunci dalam menanggapi adanya serangan mikroba dan adanya jaringan yang terluka serta dapat merangsang respon sistem kekebalan tubuh dengan mengaktifkan limfosit atau dengan menginduksi pelepasan sitokin lain yang dapat mengaktifkan makrofag, sel NK dan limfosit serta menyusun berbagai respon imun dengan memulai ekspresi gen (Low *et al.*, 2003). Pada tulisan ini, kami akan melaporkan hasil analisis kemampuan CpG DNA untuk meningkatkan ekspresi gen *interleukin 1 β* (IL1 β) pada ikan kerapu macan yang nantinya dapat dijadikan acuan dalam menentukan peranannya sebagai imunostimulan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 hingga November 2014 di Laboratorium Bioteknologi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah ikan kerapu macan sebanyak 40 ekor dengan berat rata-rata 7-10 gr. Hewan uji ditampung pada bak fiber volume 1 ton untuk proses adaptasi kemudian dipelihara dalam akuarium 50 L yang diisi air laut sebanyak 20 L. Pemberian pakan dilakukan dengan frekuensi 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari dengan dosis 5% dari biomassa. Pakan yang diberikan adalah pakan komersil dengan kandungan protein 36%.

Preparasi CpG Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) 2133

Sebelum digunakan, CpG-ODN 2133 dipreparasi terlebih dahulu sesuai petunjuk penggunaannya, yaitu membuat konsentrasi menjadi 100 μ M dengan cara menambahkan 740,4 μ L akuades steril atau *TE buffer* 1x. Selanjutnya dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 50 μ g/mL sebanyak 2000 μ l (kebutuhan 20 ekor).

Rancangan Penelitian

Sebanyak 10 ekor ikan kerapu dengan berat rata-rata 7-10 gr dimasukkan ke dalam akuarium. Ada 2 perlakuan yang diaplikasikan yaitu dengan injeksi CpG-ODN 2133 dengan konsentrasi 10 µg/ml dan kontrol yang hanya menggunakan larutan PBS.

Pemberian CpG DNA

Pemberian CpG-ODN pada hewan uji dilakukan melalui injeksi yaitu disuntikkan ke ikan kerapu macan dengan dosis 10 µg/ml (Kani *et al.*, 2012). Ikan kerapu macan kontrol diinjeksi dengan PBS dengan volume yang sama. Penyuntikan dilakukan pada bagian *intramuscular* menggunakan spuit 1 mL (*needle 26 gauge x ½"*). Pengamatan ekspresi gen imun IL-1β dilakukan pada hari ke -7 setelah injeksi.

Ekstraksi RNA

RNA total diekstraksi dari kepala ginjal ikan kerapu macan dengan menggunakan RNeasy Mini Kit (*Qiagen*), sesuai instruksi perusahaan. Sebanyak 30 mg organ ginjal ikan kerapu macan dihaluskan menggunakan mortar dan ditambahkan dengan 350 µl buffer RLT. Larutan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml bebas RNase kemudian dihomogenisasi dengan *syringe* dan *needle 20 gauge* sebanyak 5 kali dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit pada suhu 20°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml yang baru dan ditambahkan 1 kali volume ethanol 70% yaitu sebanyak 350 µl, kemudian dihomogenkan perlahan dengan menggunakan pipet. 500 µl sampel dipindahkan ke dalam *spin column* volume 2 ml bebas RNase, kemudian disentrifugasi 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Proses pencucian menggunakan 500 µl buffer RW 1, sentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Larutan pencuci pada tabung dibuang dan dengan tabung mikro yang sama, ditambahkan 500 µl buffer RPE ke dalam *spin column* kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Pencucian dengan buffer RPE dilakukan sebanyak 2 kali dan selanjutnya *spin column* disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk memastikan tidak ada buffer RPE yang tersisa di *spin column*. *Spin column* RNeasy dipindahkan ke dalam tabung mikro bebas RNase volume 1.5 µl kemudian ditambahkan 80 µl air bebas RNase ke dalam *spin column* lalu didiamkan selama 2 menit kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Cairan yang tertampung pada tabung mikro merupakan hasil ekstraksi RNA yang akan digunakan untuk tahap selanjutnya.

Uji Kualitas RNA Hasil Ekstraksi

Kualitas hasil ekstraksi RNA diuji secara kualitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya dengan genequan 1000 pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. RNA dengan tingkat kemurnian baik ditunjukkan oleh rasio A260/280 lebih dari 2.0 (Sambrook *et al.* 1989). Selain itu RNA juga diuji secara kualitatif dengan PCR menggunakan primer *β-actin*.

Sintesis cDNA dengan RT-PCR

Sintesis DNA komplementer (*complementary DNA, cDNA*). Konsentrasi RNA dibuat 3 µg dalam 30 µl DEPC 0,1 % kemudian dihomogenkan dengan vortex dengan kecepatan rendah. Tabung mikro berisi RNA dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 65°C selama 10 menit. Selanjutnya tabung mikro dimasukkan ke dalam es selama 2 menit, kemudian RNA dimasukkan ke dalam tabung *first strand reaction mix beads* (GE Healthcare) yang telah berisi 2 butir bola putih. Primer oligo (dT) 5'-GTA ATA CGA ATA ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT TTT TTT TTT TTT TTT T-3' dengan konsentrasi 1 µg/3 µl ditambahkan sebanyak 3 µl ke dalam reaksi, kemudian dibiarkan selama 1 menit. Tabung mikro diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian cDNA ditambahkan SDW sebanyak 50 µl.

Analisis Semi-Quantitative

PCR mix menggunakan kit *Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare), kemudian tambahkan cDNA yang digunakan sebagai template sebanyak 1 µl, serta masing-masing 1 µl ditambahkan primer forward dan reverse kemudian ditambahkan SDW sampai mencapai 25 µl. Amplifikasi gen imun IL-1β, menggunakan primer IL-1β-F dan IL-1β-R serta β-actin-F dan β-actin-R. Kondisi PCR untuk IL-1β-F dan IL-1β-R yaitu pre-denaturasi 95°C selama 2 menit, 35× (95°C 50 detik, 45°C selama 40 detik, 72°C selama 50 detik), dan 72°C selama 5 menit. Kondisi PCR untuk β-actinF dan β-actinR yaitu pre-denaturasi 95°C selama 2 menit, 35× (90°C selama 50 detik, 45°C selama 30 detik, 72°C selama 40 detik), dan 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis

Untuk melihat keberhasilan amplifikasi fragmen DNA target, hasil PCR dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2,0 % serta marker VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis) kemudian didokumentasikan dengan *Gel Documentation System* (Biometra).

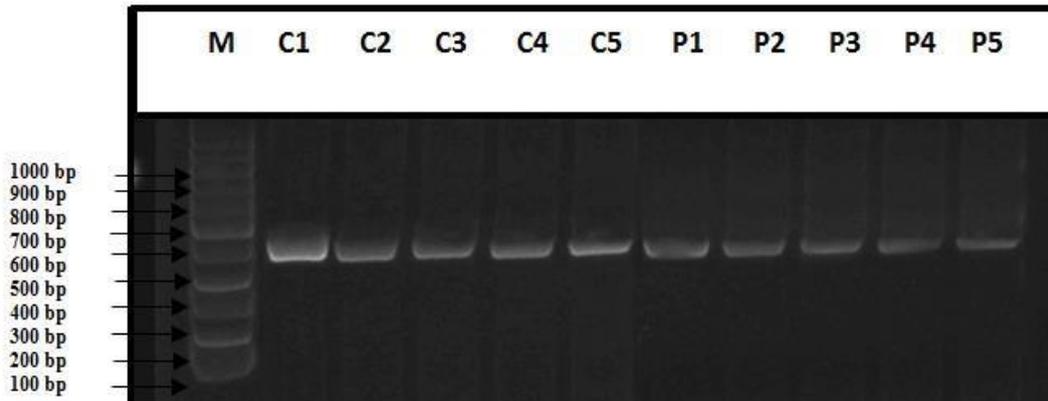
Analisis Data

Pendaran pita pada gel elektroforesis kemudian dianalisis menggunakan software UN SCAN IT berdasarkan ketebalan fragmen gen *IL-1β*, dan gen *β-aktin* sebagai kontrol internal untuk menilai perbedaan tingkat ekspresi pada ikan kerapu macan. Hasil yang diperoleh kemudian dilakukan uji statistik menggunakan uji T student.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi RNA Kepala Ginjal Ikan Kerapu Macan (*E. fuscoguttatus*)

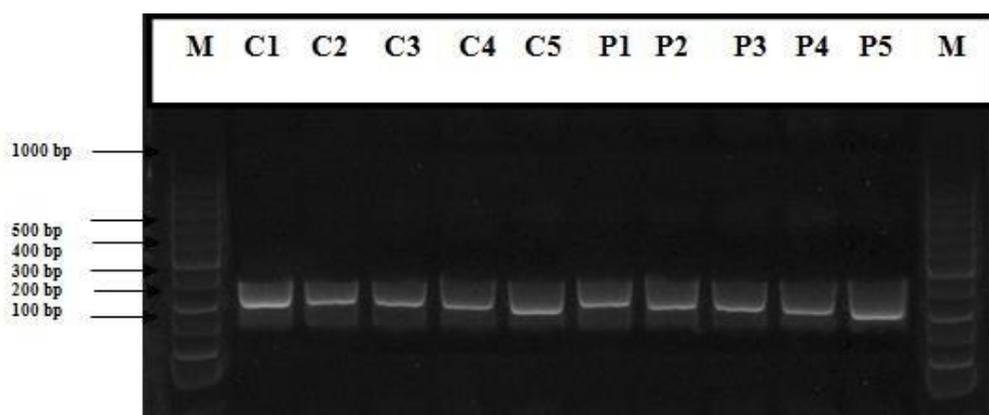
Berdasarkan hasil amplifikasi dengan primer β -aktin menggunakan PCR, diperoleh amplicon gen β -aktin ikan kerapu berukuran sekitar 500 bp yang terlihat jelas pada semua sampel baik pada perlakuan CpG maupun pada perlakuan PBS sebagai kontrol (Gambar 1). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa proses ekstraksi RNA berhasil mengisolasi total RNA pada sampel. Gen β -aktin dijadikan sebagai indikator keberhasilan ekstraksi karena sifatnya yang diekspresikan secara terus menerus di dalam sel (Sunarti *et al.*, 2016).



Gambar 1. Amplifikasi PCR β -aktin cDNA HK *E. fuscoguttatus*. Keterangan: Sumur 1 (M); marker 100 bp, sumur 2-6 (C1-C5); perlakuan CpG, sumur 7-11 (P1-P5); perlakuan PBS sebagai kontrol.

Ekspresi Gen Imun Interleukin 1 β (IL-1 β)

Visualisasi gel elektroforesis memperlihatkan pendaran pita cDNA interleukin IL-1 β pada ukuran 400 bp (Gambar 3). Pendaran pita yang tampak jelas pada semua sampel mengindikasikan adanya ekspresi gen imun interleukin IL-1 β sebagai target. Pendaran pita cDNA terlihat lebih tebal pada sumur C1-C5 yaitu pada sampel yang mendapat perlakuan CpG. Sementara pada sumur P1-P5 yang merupakan perlakuan kontrol PBS memperlihatkan pendaran pita cDNA dengan intensitas yang lebih rendah. Hal tersebut sejalan dengan nilai ekspresi RNA IL-1 β yang diperlihatkan oleh pengukuran ketebalan pendaran pita menggunakan software UN-SCAN IT (Tabel 1). Nilai tertinggi terlihat pada sampel P4 sebesar 25302 kemudian disusul oleh sampel P2 sebesar 24519, P5 sebesar 23868, P3 sebesar 20814 dan terakhir adalah P1 sebesar 19181. Sementara pada sampel kontrol PBS, nilai tertinggi terlihat pada sampel C4 sebesar 21358 kemudian disusul oleh sampel C5 sebesar 21289, C2 sebesar 19099, C1 sebesar 17708 dan terakhir pada sampel C3 sebesar 16156. Perbedaan nilai antara perlakuan injeksi CpG-ODN dengan kontrol PBS tersebut dimana perlakuan injeksi CpG-ODN menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibanding sampel kontrol menjadi indikator bahwa injeksi CpG-ODN mampu merangsang peningkatan ekspresi gen IL-1 β pada kerapu *E. fuscoguttatus*. Unmetil CpG DNA dari DNA bakteri maupun oligonukleotida sintetis (ODN) dapat mengaktifkan sel imun (Tassakka dan Sakai, 2003).



Gambar 2. Amplifikasi cDNA gen IL-1 β *E. fuscoguttatus*. Sumur 1 (M); marker 100 bp, sumur 2-6 (C1-C5); perlakuan CpG, sumur 7-11 (P1-P5); perlakuan PBS sebagai kontrol.

Hasil uji T menunjukkan adanya pengaruh yang nyata pada perlakuan injeksi CpG-ODN pada ikan kerapu *E. fuscoguttatus* (*P<0.05). Hasil yang diperoleh tersebut sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Tassakka (2005); Kono *et al.* (2001) bahwa terjadi peningkatan ekspresi gen IL-1 β setelah injeksi CpG DNA 1668 pada ikan mas *Cyprinus carpio*. Peningkatan ekspresi IL-1 β juga terdeteksi pada ikan *Atlantic salmon* dan *Rainbow trout* yang diinjeksi oleh CpG DNA (Jorgensen *et al.*, 2001).

IL-1 β merupakan salah satu sitokin yang memberikan respon awal yang cukup penting dan memungkinkan organisme untuk merespon invasi mikroba dan peradangan pada ikan *rainbow trout* dan *sea bass* (Buonocore *et al.*, 2004). Penyuntikan CpG-ODN 2133 yang diberikan pada ikan kerapu macan terbukti mampu meningkatkan ekspresi gen imun interleukin IL-1 β . Pelepasan sitokin ini kemudian akan mengaktifkan makrofag, sel NK dan limfosit serta menyusun berbagai respon imun (Low *et al.*, 2003). Kani *et al.* (2012) juga melaporkan adanya peningkatan indeks pagositosis pada penyuntikan CpG-ODN 1668 dengan dosis 0.1 μ g/ml sebesar 76% pada hari pertama injeksi. Sementara aktifitas lisosim tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan penyuntikan CpG-ODN sekuen 2003 dengan dosis 10 μ g/ml pada hari ke 7 sebesar 349 unit pada ikan kerapu macan *E. fuscoguttatus*.

PENUTUP

Penggunaan CpG DNA 2133 mampu meningkatkan ekspresi gen imun IL1 β pada ikan kerapu macan, dengan demikian, penggunaan CpG DNA 2133 memiliki potensi yang baik sebagai imunostimulan maupun adjuvan vaksin pada ikan kerapu macan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis hanturkan kepada Ibu Asmi Citra Malina, M.Agr, Ph.D. yang telah membimbing penulis baik dalam penelitian maupun penyusunan naskah ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Buonocore, F., Mazzini, M., Forlenza, M., Randelli, E., Secombes, C. J., Zou, J., & Scapigliati, G. (2004). Expression in *Escherchia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin-1 β , a possible immunoadjuvant in aquaculture. *Journal of marine biotechnology (NY)*, 6, 53-59.
- Chen, Y., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2007). Construction of a recombinant plasmid containing multi-copy CpG motifs and its effects on the innate immune responses of aquatic animals. *Fish and Shell. Immunol*, 23, 589-600.
- Handoyo. (2013). Pengaruh pemberian CpG DNA terhadap sistem kekebalan tubuh udang windu (*Penaeus monodon* Fabricus) dan ketahanannya terhadap serangan bakteri *Vibrio harveyi*. *Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Universitas Hasanuddin*.
- Jorgensen, J. B., Johansen, A., Stenersen, B., & Sommer, A. I. (2001). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate atlantic salmon (*Salmon salar* L.) Leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev Comp Immunol*, 25, 313-321.
- Jorgensen, J. B., Zou, J., Johansen, A., & Secombes, C. J. (2001). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 β and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish and Shellfish Immunol*. 1, 673-682.
- Kani, R. A., Rantetondok, A., & Malina, A. C. (2012). Pengaruh pemberian CpG-ODN terhadap sistem kekebalan tubuh ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus* FORSSKAL, 1775). *Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Universitas Hasanuddin*.
- Kono, T., & Sakai, M. (2001). The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with the immunostimulant peptidoglycan. *Fish Shellfish Immunol*, 11, 357-366.
- Krieg, A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 20, 709-760.
- Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., & Secombes, C. J. (2003). Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. *Aquaculture*, 221, 23-40.
- Nursida, N. F. (2015). Pengaruh pemberian CpG DNA terhadap ekspresi gen imun pada udang windu (*Penaeus monodon*). *Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Universitas Hasanuddin*.
- Ortuno, J., Cuesta, A., Rodrigues, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces Cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus Aurata* L.). *Immunopathol*. 85, 41-50.
- Rantetondok, A. (2002). Pengaruh imunostimulan β -glukan dan lipopolisakarida terhadap respon imun dan sintasan udang windu (*Penaeus monodon fabricius*). *Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin*.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172, 63-92.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sunarti, Y., Soejoedono, R. D., Mayasari, N. L. P., & Tahya, A. M. (2016). RNA expression of farnesoic acid O-methyl transferase in mandibular organ of intermolt and premolt mud crabs *Scylla olivacea*. *AACL Bioflux*, 9(2), 270-275.
- Tassakka., ACMAR., & Sakai, M. (2003). The invitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*. 220(1-4), 27-36.
- Tassakka., ACMAR., & Sakai, M. (2004). Expression of immune-related genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L) after stimulation by CpG oligodeoxynucleotides. *Aquaculture*, 242, 1-12.

- Tassakka., & ACMAR. (2005). *CpG oligodeoxynucleotides stimulate the immune system of common carp (Cyprinus carpio L)*. Kagoshima University.
- Thomson, A. (1994). *The cytokine handbook*. Academic Press.
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., & Sudo, T. (1984). Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis BCG: isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, 72, 955-962.
- Wibawan, I. W. T., & Soejoedono, R. D. (2013). *Intisari imunologi medis*. Institut Pertanian Bogor.