

KARAKTERISTIK SEKUEN cDNA PENGKODE GEN ANTI VIRUS DARI UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

Andi Parenrengi^{*)}, Alimuddin^{**)}, Sukenda^{**)}, Komar Sumantadinata^{**)}, dan
Andi Tenriulo^{*)}

^{*)} Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka, Maros, Sulawesi Selatan 90511
E-mail: *andi_parenrengi@hotmail.com*

^{**)} Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Kampus, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Naskah diterima: 3 Januari 2009; Diterima publikasi: 1 April 2009

ABSTRAK

Transgenesis pada ikan merupakan sebuah teknik modern yang berpotensi besar dalam menghasilkan organisme yang memiliki karakter lebih baik melalui rekombinan DNA gen target termasuk gen anti virus dalam peningkatan resistensi pada udang. Gen anti virus *PmAV* (*Penaeus monodon* Anti Viral gene) merupakan salah satu gen pengkode anti virus yang berasal dari spesies krustase. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik gen anti virus yang diisolasi dari udang windu, *Penaeus monodon*. Isolasi gen anti virus menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan selanjutnya dipurifikasi untuk sekuensing. Data yang dihasilkan dianalisis dengan program Genetyx Versi 7 dan *basic local alignment search tool* (BLAST). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen anti virus *PmAV* yang berhasil diisolasi dari cDNA udang windu dengan panjang sekuen 520 bp yang mengkodekan 170 asam amino. BLAST-N menunjukkan tingkat similaritas yang sangat tinggi (100%) dengan gen anti virus yang ada di GeneBank. Komposisi asam amino penyusun gen anti virus yang paling besar adalah serin (10,00%), sedangkan yang terkecil adalah asam amino prolin dan lisin masing-masing 1,76%. Analisis sekuen gen dan deduksi asam amino (BLAST-P) memperlihatkan adanya *C-type lectin-like domain* (CTLD) yang memiliki kemiripan dengan gen *C-type lectin* yang diisolasi dari beberapa spesies krustase.

KATA KUNCI: karakteristik, sekuen DNA, detuksi asam amino, gen anti virus, udang windu

ABSTRACT: *Characteristics of cDNA sequence encoding anti viral gene from tiger prawn, Penaeus monodon. By: Andi Parenrengi, Alimuddin, Sukenda, Komar Sumantadinata, and Andi Tenriulo*

Transgenic fish technology is a potential modern technique in producing better character organism through DNA recombinant of target genes including anti viral gene for improvement of shrimp immunity. PmAV (Penaeus monodon Anti Viral) gene is one of anti viral genes isolated from crustacean species. The research was conducted to analyze the characteristics anti viral gene isolated from tiger prawn, Penaeus monodon. Anti viral gene was isolated using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and then purified for sequencing. Data obtained were analyzed using Genetyx Version 7 software and basic local alignment search tool (BLAST). The results showed that the PmAV antiviral gene has been isolated from cDNA of tiger prawn at the position of approximately 520 bp consisting of 170 amino acids. BLAST-N showed high similarity (100%) compared to the other anti viral genes deposited at the

GeneBank. The highest percentage of amino acid encoding anti viral gene is serine (10.00%), while the lowest is proline and lysine (1.76%). Sequence analysis and amino acid deduction (BLAST-P) revealed a C-type lectin-like domain (CTLD) that is similar with the C-type lectin gene isolated from several crustacean species.

KEYWORDS: *characteristic, cDNA sequence, amino acid deduction, anti viral gene, tiger prawn*

PENDAHULUAN

Penggunaan teknik biologi molekuler untuk memproduksi strain udang yang memiliki ketahanan tinggi (resisten) terhadap patogen melalui teknologi transformasi genetik merupakan peluang strategi dalam pengendalian penyakit pada udang (Bachere, 2000). Pada dekade terakhir, resistensi terhadap patogen telah dikembangkan pada beberapa spesies tanaman dan hewan termasuk ikan dan udang. Studi introduksi gen asing ke embrio udang melalui metode transfeksi telah menghasilkan data pendahuluan yang telah memperlihatkan ekspresi sementara (*transient expression*) oleh gen reporter dengan regulator beberapa promoter heterolog. Kemajuan terbaru dalam teknologi transfer gen memiliki potensi sangat besar untuk pengembangan transgenik udang yang membawa gen resisten penyakit atau peningkatan laju pertumbuhan.

Gen pengontrol hormon pertumbuhan (*growth hormone, GH*) merupakan gen target yang paling banyak digunakan dalam transgenik ikan. Introduksi gen GH pada ikan telah berhasil diaplikasikan dalam rangka peningkatan kecepatan pertumbuhan, misalnya pada ikan rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Penman *et al.*, 1991), salmon Pasifik *Oncorhynchus* spp. (Devlin *et al.*, 1995), salmon arctic charr *Salvelinus alpinus* (Pitkanen *et al.*, 1999), mud loach *Misgurnus mizalepis* (Nam *et al.*, 2001), ikan zebra *Danio rerio* (Morales *et al.*, 2001), silver sea bream *Sparus sarba* (Lu *et al.*, 2002), nila *Oreochromis niloticus* (Rahman *et al.* 2001; Kobayashi *et al.*, 2007), coho salmon *O. kisutch* (Devlin *et al.*, 2004), dan salmon Atlantik *Salmo salar* (Yaskowiak *et al.*, 2006). Sementara itu, introduksi gen AFP (*anti-freeze protein*) pada ikan koki dapat meningkatkan toleransinya terhadap suhu dingin sampai dengan 0°C (Wang *et al.*, 1995 dalam Alimuddin *et al.*, 2003), sedangkan transfer gen GFP (*green fluorescent protein*), YFP (*yellow fluorescent protein*) dan RFP (*red fluores-*

cent protein) dapat menghasilkan ikan zebra berwarna-warni yang dapat dilihat pada kondisi cahaya biasa (Gong, 2003).

Penerapan teknologi transgenesis dalam peningkatan resistensi ikan dan udang terhadap serangan penyakit atau patogen merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah penyakit pada akuakultur. Injeksi gen pengkode *glycoprotein* IHNV (*infectious hematopoietic necrosis virus*) menggunakan promoter CMV (*cytomegalovirus*) pada salmon, menunjukkan proteksi yang signifikan setelah 8 minggu, dan masih tetap resisten serta menunjukkan antibodi penetral virus pada 12 minggu berikutnya (Traxler *et al.*, 1999 dalam Alimuddin *et al.*, 2003). Transfer gen *cecropin* dapat meningkatkan daya tahan ikan medaka terhadap *Pseudomonas fluorescens* dan *Vibrio anguillarum* (Sarmasik *et al.*, 2002). Upaya peningkatan resistensi udang windu terhadap penyakit telah dilakukan melalui injeksi protein rekombinan GST-PAP (*glutathione-S-transferase-Phagocytosis Activating Protein*) (Chotigeat *et al.*, 2007).

Transgenik udang yang berhasil dilaporkan adalah masih terbatas pada udang vaname, *Litopenaeus vannamei* dengan mengintroduksi gen pengkode anti virus TSV-CP (*taura syndrome virus coat protein*) dengan menggunakan promoter β -actin udang (p β actP2) (Sun *et al.*, 2005; Lu & Sun, 2005). Gen pengkode anti virus pada udang windu, *P. monodon* yang diberi nama PmAV telah diidentifikasi oleh Luo *et al.* (2003) dan gen *hemocyanin* oleh Zhang *et al.* (2004). Isolasi dan karakterisasi DNA komplementer (cDNA) pengkode anti virus merupakan langkah awal pada proses transfer gen dalam upaya mendapatkan spesies udang yang memiliki resistensi yang tinggi. Penelitian isolasi dan karakterisasi gen anti virus dari udang windu ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat similaritas sekuen dengan gen anti virus yang ada dalam Bank Gen. Selain itu, analisis sekuen nukleotida dan deduksi asam aminonya dilakukan untuk mengkonfirmasi kebenaran gen anti virus yang telah diisolasi.

BAHAN DAN METODE

Sampel Udang Windu, *Penaeus monodon*

Udang windu, *P. monodon* (50-70 g) yang lolos dari serangan penyakit virus bintik putih (*white spot syndrome virus*, WSSV) dikoleksi dari tambak udang di Sulawesi Selatan. Udang tersebut diharapkan memiliki gen pengkode ketahanan penyakit yang umumnya diatur oleh promoter tertentu. Hepatopankreas udang windu diambil secara aseptik sebagai bahan untuk ekstraksi RNA.

Ekstraksi RNA

Sebanyak 10-25 mg sampel hepatopankreas udang windu dimasukkan dalam tabung mikro (1,5 mL), kemudian dilarutkan dalam 200 μ L *Isogen* dalam wadah yang berisi es. Sampel yang sudah digerus dengan grinder tabung mikro ditambahkan kembali *Isogen* sampai mencapai 800 μ L, kemudian diinkubasi dalam suhu ruangan selama 5 menit agar sampel dapat terlisiskan sempurna. Sampel ditambahkan dengan 200 μ L kloroform kemudian divorteks dengan kecepatan sedang dan dibiarkan kembali dalam suhu ruangan selama 2-3 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit kemudian disimpan pada suhu ruangan selama 5 menit dan supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro baru yang telah berisi dengan 400 μ L isopropanol. Sampel dihomogenkan dengan membolak-balikkan tabung mikro secara perlahan kemudian disimpan dalam suhu ruangan selama 5-10 menit. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% dingin dan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang, dan selanjutnya tabung mikro dikering-udarkan. Pelet RNA yang tersisa dilarutkan dengan DEPC sebanyak 50 μ L.

Kemurnian dan kandungan RNA total hasil isolasi dapat diketahui dengan menggunakan alat UV-VIS spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian dihitung berdasarkan perbandingan absorbansi 260 nm dengan 280 nm, sedangkan konsentrasi DNA dapat dihitung berdasarkan absorbansi 260 nm (Linacero *et al.*, 1998).

Sintesis cDNA dengan RT-PCR

Sintesis DNA komplementer (*complementary DNA*, cDNA) dilakukan dengan menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads* (GE Healthcare, USA). Konsentrasi RNA dibuat 3 mikrogram dalam 30 μ L DEPC, kemudian dihomogenasi menggunakan vorteks dengan kecepatan rendah. Tabung mikro berisi RNA dimasukkan ke 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* yang telah berisi 2 butir bola putih. Primer oligo dT3 *race vect* (5'-gta ata cga ata act ata ggg cac gcg tgg tgc acg gcc cgg gct ggt ttt ttt ttt ttt t-t-3') dengan konsentrasi 1 μ g/3 μ L ditambahkan sebanyak 3 μ L ke dalam reaksi, kemudian dibiarkan selama 1 menit. Tabung mikro diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian cDNA ditambahkan air steril SDW sebanyak 50 μ L.

Isolasi Gen Anti Virus

Isolasi gen target (gen anti virus) dilakukan dengan menggunakan cDNA sebagai templat DNA. Gen *PmAV* diisolasi dengan menggunakan spesifik primer yang dibuat berdasarkan sekuen yang diakses pada GenBank dengan nomor aksesori AY302750.1 (Luo *et al.*, 2003). Primer yang digunakan adalah ORF*PmAV*-F 5'-tag gca atg cat atg ggt cat aca atc cta-3' dan ORF*PmAV*-R 5'-ctg tct cga gct atg tgt cct gct ttc aca-3', dengan target fragmen sepanjang 513 bp yang mencakup kodon awal dan kodon akhir. Primer tersebut telah dilengkapi dengan situs restriksi (digaris bawah) masing-masing adalah *Sph*I dan *Xho*I. Satu milligram cDNA digunakan sebagai templat untuk PCR pada kit *PureTaq RTG-PCR Beads* (GE Healthcare, USA), kemudian dicampur dengan masing-masing 1 μ L primer *forward* dan *reverse* kemudian ditambahkan air steril sampai mencapai 25 μ L.

Isolasi gen anti virus dilakukan pada mesin PCR (Applied Biosciences 7200). Proses PCR dijalankan pada suhu pre-denaturasi 94°C selama 2 menit; 35 siklus untuk denaturasi 94°C selama 30 detik, annealing 60°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 45 detik; dan final ekstensi 72°C selama 7 menit dan penyimpanan sementara pada 4°C. Untuk mengetahui keberhasilan isolasi gen target, hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1%

untuk melihat pita DNA yang terbentuk pada gel.

Purifikasi dan Sekuensing Gen Anti Virus

Gen anti virus hasil PCR selanjutnya dipurifikasi dengan menggunakan kit purifikasi gel GF-1 *Gel DNA Recovery Kit* (Vivantis, Malaysia) dengan mengacu pada prosedur standar dari manual kit yang digunakan. Hasil purifikasi selanjutnya dilakukan penderetan (sekuensing) dengan mengacu pada metode *dideoxynucleotide chain-termination* menggunakan mesin otomatis ABI PRIMS 310.

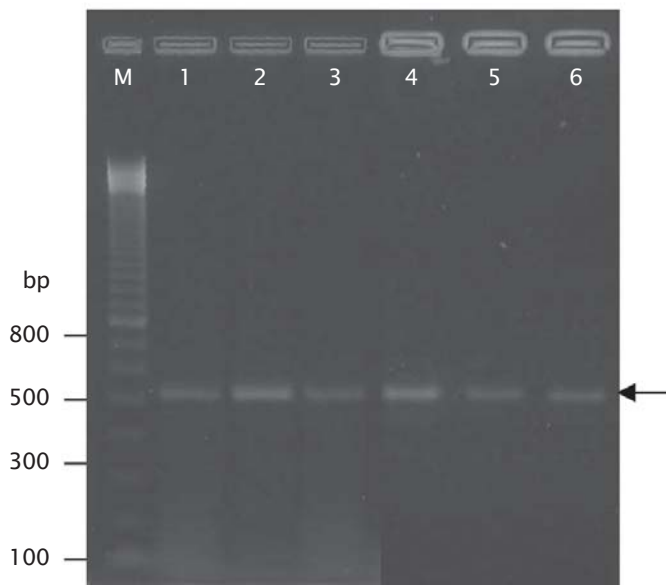
Analisis Data

Untuk mengetahui kemiripan gen yang dihasilkan, sekuen nukleotida dan deduksi asam amino gen anti virus disejajarkan (*alignment*) dengan sekuen anti virus yang telah ada di dalam Bank Gen dengan menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST-N untuk sekuen nukleotida dan BALST-P untuk sekuen protein atau asam

amino). Sekuen gen anti virus hasil penderetan dianalisis dengan menggunakan program GENETYX Versi 7 untuk mendapatkan similaritas sekuen, deduksi asam amino, dan keberadaan parameter penanda signal anti virus.

HASIL DAN BAHASAN

Gen anti virus telah berhasil diisolasi dari DNA komplementer (cDNA) hepatopankreas udang windu, *P. monodon* dengan teknik PCR. Pemisahan fragment pada gel elektroforesis memperlihatkan pita tunggal pada posisi sekitar 520 bp (Gambar 1). Gambar tersebut juga memperlihatkan bahwa dengan pemurnian/purifikasi fragmen melalui ekstraksi langsung dari gel dapat menghilangkan latar belakang (*smear*) dan *dimer* primer pada bagian bawah gel agarosa (tidak diperlihatkan dalam Gambar). Fragmen yang telah berhasil dimurnikan tersebut dijadikan sampel bahan untuk keperluan sekuensing.



Gambar 1. Fragmen tunggal gen anti virus *PmAV* yang diisolasi dari DNA komplementer (cDNA) hepatopankreas *P. monodon*. Tanda panah menunjukkan fragmen gen *PmAV* pada posisi sekitar 520bp; M=Marker DNA, 1-3=fragmen DNA hasil PCR; dan 4-6=fragmen DNA hasil purifikasi dari gel

Figure 1. Single fragment of *PmAV* anti virus gene isolated from hepatopangcreas cDNA of *P. monodon*. Arrow indicating the fragment of *PmAV* gene located at approximately 520bp in length; M=DNA marker, 1-3=DNA fragment of PCR product; and 4-6=DNA fragment of gel purification

Tabel 1. Similaritas sekuen gen anti virus *PmAV* yang diisolasi dari udang windu dengan gen anti virus yang terdapat dalam GeneBank

Table 1. Similarity index of *PmAV* anti viral gene sequence isolated from tiger prawn compared to the anti viral gene accessed at GeneBank

Deskripsi <i>Description</i>	Skor maksimum <i>Maximum score</i>	Jumlah skor <i>Total score</i>	Pemenuhan query <i>Query coverage</i>	Similaritas Max. <i>Max. identity</i>
mRNA <i>PmAV P.monodon</i> (AY302750.1)	942	942	100%	100%
Gen anti virus <i>P. monodon</i> (DQ641258.1)	457	919	96%	100%

Analisis BLAST-N terhadap gen anti virus yang didapatkan menunjukkan kemiripan sekuen yang identik (100%) dengan gen anti virus, baik yang diisolasi dari mRNA (AY302750.1) maupun yang berasal dari genom DNA (DQ641258.1) udang windu, *P. monodon*. Perbedaan *query* dari kedua gen tersebut adalah 100% dapat dipenuhinya oleh gen yang diisolasi dari mRNA, sedangkan hanya 96% pada gen yang diisolasi dari genom DNA (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa sekuen gen anti virus udang windu (*PmAV*) yang diisolasi dari mRNA identik dengan sekuen dari gen yang diisolasi pada penelitian ini, tetapi hanya sebagian besar sekuen anti virus dari genom DNA yang dapat disejajarkan yang mungkin disebabkan oleh keberadaan sekuen UTR (*untranslated region*), intron, dan *Poly-A*. Hasil penjejajaran tersebut memberikan keyakinan bahwa gen yang telah berhasil diisolasi dari udang windu adalah gen anti virus *PmAV*.

Tingginya similaritas sekuen nukleotida tersebut memberikan indikator dalam kemiripan deduksi asam amino yang diperoleh setelah translasi melalui program Genetyx. Translasi asam amino diawali dengan sekuen ATG atau dikenal dengan kodon awal yang disandikan oleh asam amino metionin (M). Sedangkan kodon akhir ditandai dengan sekuen TAA yang tidak ditranslasi ke dalam bentuk asam amino, tetapi merupakan sekuen signal berakhirnya aktivitas translasi. Deduksi asam amino dari sekuen gen anti virus yang diisolasi dari udang windu, secara lengkap disajikan pada Gambar 2.

Analisis domain deduksi protein dari cDNA anti virus udang windu menunjukkan adanya situs yang memiliki kemiripan dengan *C-type lectin-like domain* (CTLD). Susunan CTLD

tersebut diperkirakan berada dari urutan asam amino ke-33 sampai dengan ke-166. Hasil penjejajaran asam amino (Gambar 3) menunjukkan bahwa pada urutan ke-33 (sistein) merupakan asam amino pertama yang sama pada gen kelompok *C-type lectin* pada spesies krustase. CTLD tersebut merupakan salah satu indikator utama dalam prediksi karakter gen fungsional anti virus. Lektin (*lectin*) adalah merupakan kelompok glikoprotein yang dapat berperan dalam penggumpalan darah (Yatim, 2003), sehingga lektin dikenal juga sebagai salah satu kelompok gen *clotting* protein (Dong & Xiang, 2007). Keberadaan CTLD juga telah dilaporkan oleh Luo *et al.* (2003) pada gen anti virus yang diisolasi dari udang windu dan Kong *et al.* (2008) pada kepiting *Portunus trituberculatus*.

Meskipun pada umumnya lectin memperlihatkan aktivitas pengikatan (*bind*) dalam mendeteksi struktur gula, fungsi mereka pada beberapa organisme berbeda adalah tidak sama. Zelenksky & Gready (2005) telah mereview dengan lengkap fungsi secara luas dari beberapa famili lectin khususnya *C-type lectin-like domain*. Lektin dikenal memiliki peran penting dalam sistem pertahanan non-spesifik pada invertebrata berdasarkan studi analisis biokimia dari molekuler pada beberapa spesies krustase. Kebanyakan lectin krustase termasuk spesies penaeid, memiliki spesifitas yang umum pada *N-acetylated amino sugar* khususnya asam sialat (*sialic acid*) (Marques & Barracco, 2000). Analisis hambatan hemaglutinasi (*hemagglutination inhibition*, HAI) lectin kepiting air tawar, *Paratelphusa jacquemontii* menunjukkan aktivitas sebagai asam sialat spesifik yang memiliki afinitas tinggi pada *O-acetyl neuraminic acid* (Denis

```

10      20      30      40      50      60
atgCGTcatacaaatcctagTtttccTttccctCGgtgtTgtTgggtCGgctgtggcaaca
M R H T I L V F L S L G V V G S A V A T

70      80      90      100     110     120
tcatacGagaaaagtGCCaatgattccaaggctgtctGctatagcccctataactGCCatt
S Y E K S A N D S K A V C Y S P Y T A I

130     140     150     160     170     180
gCGgatCGctgtTttgtTgtcgatcaccagacagatggaagctGGtatgacatgCGgagag
A D R C L F V D H Q T D G S W Y D M R E

190     200     210     220     230     240
tactgtaaccttataaatGGagactTtctcaagctGGatgacGctaatctccttactgat
Y C N L I N G D F L K L D D A N L L T D

250     260     270     280     290     300
atCGttgagTactacttaccAagTgggtgtgaacagagactactGGatCGggggggagt
I V E Y I T Y Q V G V N R D Y W I G G S

310     320     330     340     350     360
gacgagaaccacgaggggtctTtggctgtggacGGacggaactctcatgCGgacaggtgtT
D E N H E G L W L W T D G T L M R T G V

370     380     390     400     410     420
ccctTgtGGtaccattGCacctccatctctcaacaaccagatGGtGGctcctcagagaac
P L W Y H C T S I S Q Q P D G G S S E N

430     440     450     460     470     480
tgtGccgtcatgCGctgggactcattttaccatattccatgatgtgtctTgctacactTct
C A V M R W D S F Y H I H D V S C Y T S

490     500     510
CGgtctgtcattTgtgaaagcaggacacat
R S V I C E S R T H

```

Gambar 2. Sekuen nukleotida dan hasil deduksi asam amino penyusun gen anti virus *PmAV* yang diisolasi dari udang windu, *P. monodon*. Prediksi signal CTLD diindikasikan dengan huruf tebal; huruf kecil simbol nukleotida a=Adenin, c=Sitosin, g=Guanin, t=Timin; dan deduksi asam amino (huruf kapital) A=Alanin, R=Arginin, N=Asparagin, D=Asam aspartat, C=Sistein, G=Glisin, E=Asam glutamate, Q=Glutamin, H=Histidin, I=Isoleusin, L=Leusin, K=Lisin, M=Metionin, F= Fenilalanin, P=Prolin, S=Serin, T=Treonin, W=Triptofan, Y=Tirosin, dan V=Valin

Figure 2. Nucleotide sequence and amino acid deduction of *PmAV* anti viral gene isolated from tiger prawn, *P. monodon*. Predicted CTLD is shown in bold letters; nucleotide symbol (small letters) a=Adenine, c=Cytosine, g=Guanine, t=Thymine; and amino acid deduction (capital letters) A=Alanine, R=Arginine, N=Asparagine, D=Aspartic acid; C=Cysteine, G=Glycine, E=Glutamic acid, Q=Glutamine, H=Histidine, I=Isoleucine, L=Leucine, K=Lysine, M=Methionine, F=Phenylalanine, P=Proline, S=Serine, T=Threonine, W=Tryptopan; Y=Tyrosine, and V=Valine

Karakteristik sekuen cDNA pengkode gen anti virus (Andi Parenrengi)

<u>SAMPEL</u>	1	MRHTILVFLSLGVVGSVAVATSYEKSANDSKAVCYSPTYTAIAD-RCLFVDHQTDGSSWYDMR	59
<u>AAQ75589</u>	1	59
<u>ACC86854</u>	6	L...VGILAV..ATNI.P..TK---.H..F.E.SG-..VHI.VSKT.T.QN..	54
<u>ABI97374</u>	190	..ALAPFGP..VGGRVS.PVLFIIE.GG-L..MFVTWAEET.E.A.	233
<u>ABI97374</u>	48	..PGG.SLVG.-K..LFVTFVAEPYGEA.	74
<u>ABI97372</u>	200	..ALAPFGP..VS.RVT.PILFVEVGG-L.MMFVTWEEET.E.A.	243
<u>ABI97372</u>	55	A.PGG.SLVGA-K.PMFVTFIAQPYSEA.	82
<u>ACJ06428</u>	178	AA..ALAPLGP..VGGRVE.LA.FVEVGG-L..LFVTWFEDT.ENAQ	223
<u>ACJ06428</u>	36	..PGG.LVGT-K..MFEIFASETHEEAK	62
<u>ABI97373</u>	180	..ALVPFGP..VGGRVT.PDLFVEVGG-L.MAFVTWAEVT.E.AG	223
<u>ABI97373</u>	36	..PGG.LVGT-K..MFEIFASETHEEA.	62
<u>ABA54612</u>	1	MK..APVILTTLISVA--A..SVRATE.P...EPLDET..I.L.AFVSYT.QETV	53
<u>ACJ06429</u>	36	..PEG.SLVGS-Q..MFVTFAVENHREAK	62
<u>ACJ06429</u>	199	..PTF.VEVGG-L..MFVTWAVET.HEAQ	225
<u>ABU62825</u>	1	MK..APVILTALISVASVR.-.----.PY..EPLD.T.RI.L.AYVYTT.Q.TV	50

<u>SAMPEL</u>	60	EYCNLINGDFLKLDDANLLTDIVE-----YITYQ-VGVNRDYWIGGSDENHEGLWLWTD	112
<u>AAQ75589</u>	60	112
<u>ACC86854</u>	55	KF.QQLG..LVN.S.LQFYG..LL-----.ESL-HLPHASF..AT..AT.DV.M..	107
<u>ABI97374</u>	234	RA.AGASAEI.AIT.VEVFRALYL-----.HQD-NLSSHAF.L..T.LAS..T.VY.T	286
<u>ABI97374</u>	75	QF.HAAK.ELAAITT.ADFKNTID-----.HAN-GLSGTSF.LD...AA..V.VTSS	127
<u>ABI97372</u>	244	QA.AGASS.L.AIT.IEV.RAVYL-----F.HAN-SLSGHTF.L...MAS..T.VY.T	296
<u>ABI97372</u>	83	QF.HAAK.ELTAITT.TDFKNL.D-----.NAN-DFTSG.F.LD.T..AT..V.VTSS	135
<u>ACJ06428</u>	224	QM.AGTSS.L.AIT.IEV.RTLYL-----F.QAN-GLDGNTF.L...LAS..T.VY.T	276
<u>ACJ06428</u>	63	NF.HDAQ.ELASITT.TDFKNL.D-----.HAN-DLFG.TF.VD.R..ET..V..TSS	115
<u>ABI97373</u>	224	QV.AGLS..L.AIT.IEV.RALYL-----F.QTN-GLSGNTF.L...QES..T.VY.T	276
<u>ABI97373</u>	63	YF.HDAK.ELVAITT.TDFKNL.D-----.HAN-GLFG.TF.VD.R..ET..V..TAS	115
<u>ABA54612</u>	54	DL.KSHG.EI.TIE.CETFALVYD-----.RS.D.TKGGH..L.AT..VE..T.KFVN	107
<u>ACJ06429</u>	63	QT.HSVS.EL.AITPTQFVHV.N-----H.HAY-GYTG.QF.LD...AEK..N.VTSS	115
<u>ACJ06429</u>	226	QT.G-DSS.L.AIT..EV.RAVYL-----LHQE-NIADHSF.L...S.-.RN.VP.T	276
<u>ABU62825</u>	51	DP.KTHS.EI.MIE.CETFALVYD-----.KSKD.TQGGHFR.L.AT..VE..T.KFVN	104

<u>SAMPEL</u>	113	GTLMRGTGVLW---YHCTSI-S-QQPD-GG-SSEN---CAVMRWSDFYHIHDVSCY-TS	160
<u>AAQ75589</u>	113	160
<u>ACC86854</u>	108	..PV.M.T.F.---ANYGDNNY.M.T-..-EKQ.---.VMLDVNFH.YFN.FT.SN.D	157
<u>ABI97374</u>	287	.EPVPM.T.F.GL--AGSASA-.E...-TNQ.----.LAITGEGYFNFR.Y.A-SK	336
<u>ABI97374</u>	128	.EVVPL.T.F.---AAFPN-G-.....-N-AH..EHYL.LSSS.--LYMN.A.SS-AI	175
<u>ABI97372</u>	297	.EPVPM.T.F.GL--NDMSAP-.E.N-...-T.....LAI--GI..NFR.Y..G-SR	344
<u>ABI97372</u>	136	.EAVPL.T.F.---AAFGL-...YVN-GKKH---LFLPPAF.FYMGNNP.S-AV	183
<u>ACJ06428</u>	277	.EPVPM.T.F.GL--ADMSAP-.E.N-...-T.....LAI--GN..NFR.Y..G-SK	324
<u>ACJ06428</u>	116	.EAVPL.T.F.AAFD-.....-NSLGN.H----LSIPS.W.LYMN..P.S-NI	163
<u>ABI97373</u>	277	.EPVPM.T.F.GL--TDMSAP-.E.N-.E-T.....LAI--GN..NFR.Y..G-SV	324
<u>ABI97373</u>	116	.EVVPS.T.F.AAFE-.....-NALGN.H----LSIPS.W.LYMN..V.S-NK	163
<u>ABA54612</u>	108	NR.TPM.I.Y.-----GV-NE.N-N.-NTY.----.M.HASYNHYWY.AA.G-SK	150
<u>ACJ06429</u>	116	.QAVPR.T.F.---A-AFQDT-....-NAHGA.H----LE.ESS.FYLN.AV.E-DK	163
<u>ACJ06429</u>	277	.ESVPM.T.F.GL--RGD.VM-.E.Q-...-TR-....LMLHSGGSHYFR..T.S-MR	326
<u>ABU62825</u>	105	NRAVPQ...F.-----GK-GE.N-S.-NTH.-----I.HASYNHYWY.IQ.E-NK	147

<u>SAMPEL</u>	161	RSVICESRTH	170
<u>AAQ75589</u>	161	170
<u>ACC86854</u>	158	V.P...K	164
<u>ABI97374</u>	337	FNPL.	341
<u>ABI97374</u>	176	INF...A	182
<u>ABI97372</u>	345	FNPL.	349
<u>ABI97372</u>	184	KNF...ATNQ	193
<u>ACJ06428</u>	325	FFPL.IY.	332
<u>ACJ06428</u>	164	KNF...ATVQ	173
<u>ABI97373</u>	325	FYPL.	329
<u>ABI97373</u>	164	KNF...ATVQ	173
<u>ABA54612</u>	151	YNP..	155
<u>ACJ06429</u>	164	SNF..Q	169
<u>ACJ06429</u>	327	LNP..	331
<u>ABU62825</u>	148	YNP..LKK	155

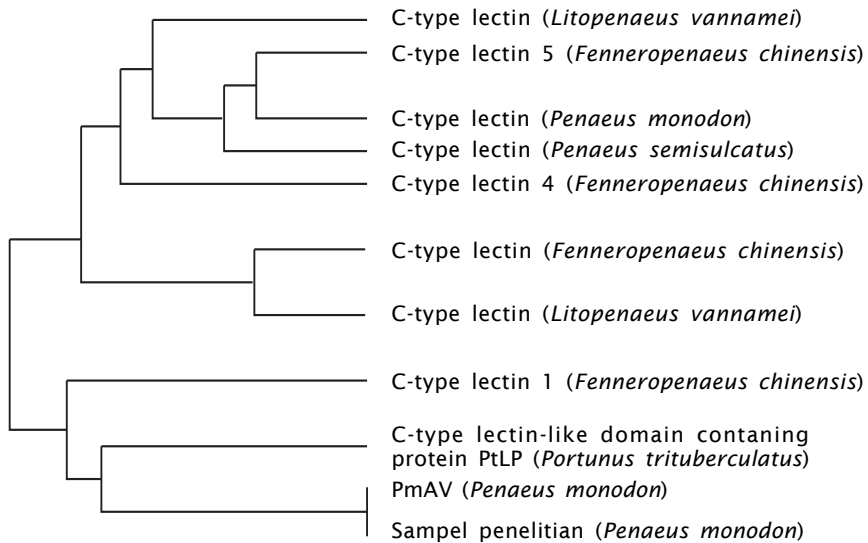
Gambar 3. Penyejajaran deduksi asam amino gen anti virus yang diisolasi dari udang windu, *P. monodon* dengan asam amino yang ada dalam Bank Gen (Sampel=gen anti virus yang diisolasi dalam penelitian ini; AAQ75589=*PmAV Penaeus monodon*; ACC86854=C-type lectin-like domain-containing protein PtLP *Portunus trituberculatus*; ABI97374= C-type lectin C-type lectin *Litopenaeus vannamei*; ABI97372= C-type lectin *Penaeus semisulcatus*; ACJ06428= C-type lectin 5 *Fenneropenaeus chinensis*; ABI97373= C-type lectin *Penaeus monodon*; ABA54612= C-type lectin *F. chinensis*; ACJ06429= C-type lectin 4 *F. chinensis*; dan ABU62825= C-type lectin *L. vannamei*)

Figure 3. Alignment of amino acid deduction of anti viral gene isolated from tiger prawn, *P. monodon* compared to the other genes at the GenBank. (Sample=anti viral gen isolated from tiger prawn on this research; AAQ75589=*PmAV P. monodon*; ACC86854=C-type lectin-like domain-containing protein PtLP *Portunus trituberculatus*; ABI97374= C-type lectin C-type lectin *Litopenaeus vannamei*; ABI97372= C-type lectin *Penaeus semisulcatus*; ACJ06428= C-type lectin 5 *Fenneropenaeus chinensis*; ABI97373= C-type lectin *P. monodon*; ABA54612= C-type lectin *F. chinensis*; ACJ06429= C-type lectin 4 *F. chinensis*; and ABU62825= C-type lectin *L. vannamei*)

et al., 2003). Sedangkan studi yang dilakukan oleh Ma et al. (2007) memperlihatkan indikasi peranan penting molekul lectin pada mekanisme pertahanan inang dekapoda dalam pembersihan infeksi patogen. Studi yang dilakukan oleh Sun et al. (2007) mengindikasikan bahwa lectin vaname *L. vannamei* memperlihatkan hambatan yang luas pada lipo-polisakarida bakteri gram negatif yang mengindikasikan peranan signifikan secara in

vivo pada *agglutinin humoral* dalam respon inang melawan infeksi bakteri.

Pada studi lainnya, kloning gen lectin pada level molekuler dan karakteriasi *C-type lectin* telah dilaporkan, misalnya pada udang windu, *P. monodon* yang dikenal dengan anti virus lectin-like protein dengan *carbohydrate-recognition domain* (CRDs) (Luo et al., 2003) dan lectin yang memiliki kemampuan



Gambar 4. Filogenetik gen anti virus yang diisolasi dari udang windu, *P. monodon* berdasarkan deduksi asam amino cDNA

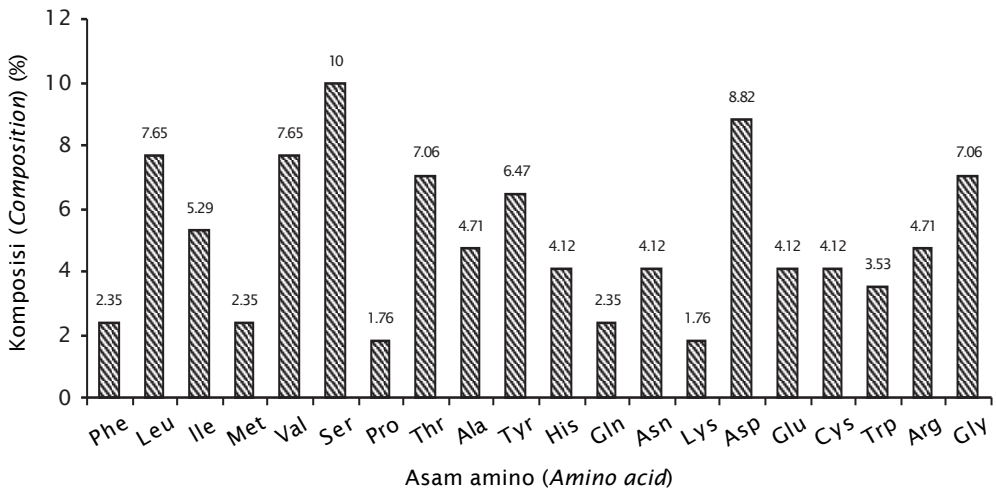
Figure 4. Phylogenetic of anti viral gen isolated from tiger prawn, *P. monodon* based on the amino acid deduction of cDNA

pengikatan lipo-polisakarida (Zhang *et al.*, 2004). Selanjutnya Luo *et al.* (2006), melaporkan bahwa lectin dari cDNA udang *P. monodon* (PmLec) berperan dalam imunitas non-spesifik khususnya dalam fungsinya sebagai pengenal protein dan opsonin. Zhao *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa C-type lectin khususnya C-type lectin 1 dari *L. vannamei* (LvCTL1) memperlihatkan aktivitas yang sangat tinggi melawan WSSV melalui interaksi beberapa protein WSSV.

Gambar filogenetik (Gambar 4) menunjukkan bahwa gen anti virus yang ditemukan memiliki deduksi asam amino yang identik dengan gen anti virus *PmAV* dengan nomor aksesinya AAQ75589.1 pada Bank Gen. Keberadaan CTLD pada gen yang diisolasi juga didukung dengan kemiripan gen pengkode CTLD yang telah diisolasi dari kepiting, *Portunus trituberculatus* yang dikenal sebagai *C-type lectin-like domain-containing protein PtLP* dengan nomor aksesinya ACC86854.1. Selain itu, Gambar 4 memperlihatkan kekerabatan beberapa gen yang mengkodekan *C-type lectin* yang diisolasi dari beberapa spesies

krustase misalnya dari *L. vannamei* (nomor aksesinya AB197374.1; ABU62825.1), *P. semisulcatus* (nomor aksesinya AB197372.1), *F. chinensis* (ACJ06428.1; ABA54612.1; ACJ06429.1), *P. monodon* (nomor aksesinya AB197373.1; AAZ29608.1).

Gen anti virus yang diisolasi dari udang windu ini tersusun atas 170 asam amino yang dideduksi dari sekuen cDNA. Komposisi asam amino penyusun gen anti virus yang terbesar adalah serin (10,00%), sedangkan yang terkecil adalah asam amino prolin dan lisin masing-masing 1,76%. Komposisi deduksi terhadap 20 jenis asam amino dari sekuen cDNA anti virus dari udang windu disajikan pada Gambar 5. Deduksi asam amino yang didapatkan pada gen anti virus tersebut lebih besar dibandingkan dengan beberapa deduksi asam amino dari gen antimikroba yang ditemukan sebelumnya, misalnya gen PAP (*phagocytosis activating protein*) terdiri atas 546 bp yang mengkode 144 asam amino (Chotigeat *et al.*, 2007), antimikroba peptida krustase (penaeidin, P3-a) tersusun atas 82 asam amino (Destoumieux *et al.*, 1997).



Gambar 5. Komposisi asam amino yang terdapat pada gen anti virus yang diisolasi dari udang windu, *P. monodon* (Phe=Fenilalanin, Leu=Leusin, Ile=Isoleusin, Met=Metionin, Val=Valin, Ser=Serin, Pro=Prolin, Thr=Treonin, Ala=Alanin, Tyr=Tirosin, His=Histidin, Gln=Glutamin, Asn=Asparagin, Lys=Lisin, Asp=Asam aspartat, Glu=Asam glutamat, Cys=Sistein, Trp=Triptofan, Arg=Arginin, dan Gly=Glisin)

Figure 5. Composition of amino acid in antiviral gene isolated from tiger prawn, *P. monodon* (Phe=Phenylalanine, Leu=Leucine, Ile=Isoleucine, Met=Methionine, Val=Valine, Ser=Serine, Pro=Proline, Thr=Threonine, Ala=Alanine, Tyr=Tyrosine, His=Histidine, Gln=Glutamine, Asn=Aspartic acid, Lys=Lysine, Asp=Asparagine, Glu=Glutamic acid, Cys=Cysteine, Trp=Tryptopan, Arg=Arginine, and Gly=Glycine)

Komposisi yang sama juga telah dilaporkan pada deduksi asam amino dari sekuen cDNA *PmAV* yang diisolasi dari udang windu (Luo *et al.*, 2003). Hal yang relatif berbeda, didapatkan pada deduksi asam amino pada gen GH pada umumnya. Syaifudin (2006) menemukan bahwa gen GH dari cDNA ikan kerapu bebek tersusun atas 205 asam amino dimana komposisi terbesar adalah asam amino leusin (14,63%) dan serin (12,20%) dan terkecil adalah triptofan (0,49%). Berbeda halnya dengan gen antimikroba penaeidin dimana deduksi asam aminonya memperlihatkan persentase asam amino prolin sangat tinggi (22%-29%) pada daerah hulu dan asam amino sistein (19%-23%) pada daerah hilir (Destoumieux *et al.*, 1997; 2000).

Isolasi dan identifikasi gen pengkode ketahanan penyakit merupakan langkah awal yang dilakukan dalam upaya peningkatan imunitas pada udang. Dong & Xiang (2007) telah menemukan sedikitnya 34 gen yang dilibatkan dalam fungsi pertahanan/imunitas pada haemocyte pustaka cDNA dari udang *F. chinensis*, dimana 38% di antaranya teridentifikasi sebagai gen antimikroba peptida (AMP, penaeidin dan antilipopolsaccharida), sedangkan selebihnya adalah gen sistem pro-phenoloksidase (32%) misalnya proPO, serin proteinase; gen *clotting* protein (15%) misalnya lectin, transglutaminase; gen signal transduksi inter-selular (9%) misalnya peroxinectin, integrin; dan gen shaperone protein (6%) misalnya HSP70, thioredoxin peroxidase.

Pendekatan teknologi rekombinan khususnya vaksin DNA telah mulai diaplikasikan pada akuakultur. Penyuntikan salmon Atlantik dengan plasmid pengkode glikoprotein IHNV dengan menggunakan promotor *cytomegalovirus* (pCMV) menunjukkan proteksi yang signifikan dengan adanya pembentukan antibodi penetral virus setelah imunisasi dan titernya meningkat setelah ujiantang (Traxler *et al.*, 1999 dalam Alimuddin *et al.*, 2003).

Salah satu mekanisme yang potensial dalam peningkatan resistensi penyakit adalah produksi hewan akuatik transgenik yang mengandung gen antimikroba peptida. Beberapa informasi telah tersedia luas terkait dengan antibakteri peptida (Bevins & Zasloff, 1990; Lehrer *et al.*, 1993; Boman, 1996; Hoffmann *et al.*, 1996; Hancock, 1997) dimana

organisme yang mengandung gen pengkodernya memperlihatkan resistensi patogen yang lebih tinggi. Penemuan cecropin (*cationic peptide*) (Steiner *et al.*, 1981) sebagai antibakteri merupakan awal dari penelitian antimikroba yang selanjutnya diidentifikasinya beberapa antimikroba lainnya. Struktur yang unik dari cecropin dapat menyebabkan penyatuan sampai membran seluler bakteri, jamur, dan parasit sehingga membentuk pori pada membran yang menyebabkan kematian pada patogen (Bechinger, 1997). Studi *in vitro* mengindikasikan bahwa transgenesis menggunakan konstruksi cecropin dapat meningkatkan resistensi organisme. Introduksi konstruksi lytic peptida cecropin-B meningkatkan resistensi terhadap bakteri sampai dengan empat kali lipat pada channel catfish (Dunham *et al.*, 2002). Hal yang sama juga ditunjukkan pada transgenik ikan medaka yang memiliki resistensi lebih tinggi dibandingkan dengan ikan non-transgenik terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Vibrio* sp. (Sarmasik *et al.*, 2002). Gen lysozyme telah dilaporkan merupakan salah satu gen pengkode ketahanan penyakit khususnya antimikroba yang tidak spesifik (Austin & Allen-Austin, 1985 dalam Alimuddin *et al.*, 2003). Dengan menggunakan konstruksi promotor *ocean pout AFP* dan gen lysozyme yang diintroduksi ke ikan salmon menunjukkan adanya kemampuan melawan berbagai jenis mikroba (resisten).

Pada krustase, khususnya pada udang, peningkatan resistensi melalui teknologi transgenesis masih terbatas. Chotigeat *et al.* (2007) juga telah berhasil mengidentifikasi gen PAP yang memiliki aktivitas dalam peningkatan fagositas haemocyte pada udang windu sehingga dengan injeksi intra-muscular dapat meningkatkan resistensi udang windu terhadap WSSV dibandingkan dengan kontrol (tanpa injeksi gen PAP). Penemuan gen pengkode antimikroba penaeidin membuka peluang dalam peningkatan imunitas udang melawan serangan patogen. Aplikasi penaeidin telah memperlihatkan efek peningkatan resistensi pada udang *L. vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997). Induksi imun pada udang melalui vaksinasi telah dilaporkan dengan penggunaan rekombinan protein WSSV pada udang *P. chinensis* (Kim *et al.*, 2004), antiviral menggunakan double-strand RNA (*double-stranded* RNA, dsRNA) pada udang *L. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

KESIMPULAN

Gen anti virus *PmAV* telah berhasil diisolasi dari cDNA udang windu, *P. monodon* yang memiliki sekuen yang identik (100%) dengan gen anti virus yang ada pada Bank Gen. Gen anti virus tersebut tersusun atas 170 asam amino, dimana komposisi asam amino penyusun gen tersebut tertinggi adalah serin (10,00%), sedangkan yang terkecil adalah prolin dan lisin masing-masing 1,76%. Analisis sekuen memperlihatkan keberadaan *C-type lectin-like domain* (CTLD) yang merupakan indikator utama suatu gen pengkode anti virus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN dari DIPA Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP) Maros, Tahun Anggaran 2007. Ucapan terima kasih disampaikan kepada kepala dan peneliti/teknisi BRPBAP Maros serta staf Laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, IPB, Bogor yang telah membantu kelancaran pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Yoshizaki, G., Carman, O., & Sumantadinata, K. 2003. Aplikasi transfer gen dalam akuakultur. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 2(1): 41-50.
- Bachere, E. 2000. Introduction shrimp immunity and diseases control. *Aquaculture*, 191: 3-11.
- Bechinger, B. 1997. Structure and function of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membran Biology*, 156: 197-211.
- Bevins, C.L. & Zasloff, M. 1990. Peptides from frog skin. *Annu Rev Biochem.*, 59: 395-414.
- Boman, H.G. 1996. Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 43: 475-482.
- Chotigeat, W., Deachamag, P., & Phongdara, A. 2007. Identification of a protein the phagocytosis activating protein (PAP) in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture*. 271: 112-120.
- Denis, M., Palatty, P.D.M., Bai, N.R., and Suriya, S.J. 2003. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. *Eur. J. Biochem.*, 270: 4,348-4,355.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorselaer, Rodriguez, J., & Bachere, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry*, 272(45): 28,398-28,406.
- Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P., and Bachere E. 2000. Review: penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *CMLS Cellular and Molecular Life Science*, 57: 1,260-1,271.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaidson, E.M., Du, S.J., and Hew, C.L. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Can J Fish Aquat Sci.*, 52: 1,376-1,384.
- Devlin, R.H., Biagi, C.A., & Yesaki, T.Y. 2004. Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture*. 236: 607-632.
- Dong, B. & Xiang, J.H. 2007. Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from *Fennaropenaeus chinensis* by EST annotation. *Aquaculture*, 272: 208-215.
- Dunham, R.A., Warr, G., Nichols, A., Duncan, P.L., Argue, B., Middleton, D., & Liu, Z. 2002. Enhanced bacterial diseases resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Mar Biotechnol.*, 4: 338-344.
- Gong, Z. 2003. Generation of living color transgenic zebrafish. In Shimizu, N., Aoki, T., Hirono, I., Takashima F (Eds.): *Step Toward a Green Future*, p. 329-339.
- Hancock, R.E.W. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet*, 349: 418-422.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., & Hetru, C. 1996. Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology*, 8: 8-13.
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, S.O., Yang, S.Y., & Kim, J.W. 2004. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture*, 237: 21-30.
- Kobayashi, S.I., Alimuddin, Morita, T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone showed reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270: 427-435.

- Kong, H.J., Park, E.M., Nam, B.H., Kim, Y.O., Kim, W.J., Park, H.J., Lee, C.H., & Lee, S.J. 2008. A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus* [abstract]. *Fish Shellfish Immunology*, 25(3): 311-314.
- Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., & Ganz, T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol.*, 11: 105-128.
- Linacero, R.J., Rueda, & Vazquez, A.M. 1998. Quantification of DNA. In Karp AP, Isaac G, Ingram DS (Editors.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman and Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, p. 18-21.
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., & Chen, T.T. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Marine Biotechnology*, 4: 328-337.
- Lu, Y. & Sun, P.S. 2005. Viral resistance in shrimp that express an antisense taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Research*, 67: 141-146.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z., & Xu, X. 2003. *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letter*, 551: 53-57.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., & Xu Xun. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon* [abstract]. *Development & Comparative Immunology*, 30(7): 607-617.
- Ma, T.H.T., Tiu, S.H.K., He, J.G., & Chan, S.M. 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 430-437.
- Marques, M.R.F. & Barracco, M.A. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, 191: 23-44.
- Morales, R., Herrera, M.T., Arenal, A., Cruz, A., Hernandez, O., Pimentel, R., Guillen, I., Martinez, R., & Estrada, M.P. 2001. Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Biotechnology*, 4(2): 52-58.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., and Kim, D.S. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research*, 10: 353-362.
- Penman, D.J., Iyengar, A., Beeching, A.J., Rahman, M.A., Sulaiman, Z., and Maclean, N. 1991. Patterns of transgens inheritance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Rep Dev.*, 30: 201-206.
- Pitkanen, T.I., Krasnov, A., Teerijoki, H., & Molsa, H. 1999. Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): I. Growth response to various GH constructs. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 15: 91-98.
- Rahman, M.A., Ronyai, A., Engidaw, B.Z., Jauncey, K., Hwang, G.L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L., & Maclean, N. 2001. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *J Fish Biol.*, 59: 62-78.
- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrata. *Journal of Virology*, 78(19): 10,442-10,448.
- Sarmasik, A., Warr, G., & Chen, T.T. 2002. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogen. *Mar Biotechnol.*, 4: 310-322.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., & Boman, H.G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246-248.
- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, K., & Luo, Z. 2007. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 292-299.
- Sun, P.S., Venzon, N.C., Calderon, F.R.O., & Esaki, D.M. 2005. Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 243: 19-26.
- Syaifudin, M. 2006. *Isolasi dan karakterisasi cDNA hormone pertumbuhan ikan kerapu bebek (Cromileptes altivelis)*. Thesis Sekolah Pasacasarjana, Institut Pertanian Bogor, 63 hlm.
- Yatim, W. 2003. *Kamus Biologi*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta, 907 hlm.
- Yaskowiak, E.S., Shears, M.A., Agarwal-Mawal, A., & Fletcher, G.L. 2006. Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1 α) respon-

- sible for enhanced growth rate in Atlantic salmon. *Transgenic Research*, 15: 465-480.
- Zelensky, A.N. & Gready, J.E. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS Journal*, 272: 6,179-6,217.
- Zhang, X., Huang, C., & Qin, Q. 2004. Antiviral properties of haemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Research*, 61: 93-99.
- Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., Weng, S.P., Rao, X.Y., Dai, Z.X., Luo, Y.W., Yang, G., Li, Z.S., Guan, H.J., Li, S.D., Chan, S.M., Yu, X.Q., & He, J.G. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity [abstract]. *Journal of Virology*, 38(1): 347-356.