

Karakterisasi Genetik Fragmen Gen Penyandi RNA Polimerase *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) yang Menginfeksi Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei* Boone.) dari Lampung, Gresik dan Pontianak

Yason Lukman Sudjito¹, Christina Retna Handayani², Hermin Pancasakti Kusumaningrum¹ dan Anto Budiharjo¹

1. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang 50275 Telepon (024)7474754; Fax. (024)76480690

2. Laboratorium Biologi Molekuler, Manajemen Kesehatan Hewan Akuatik (MKHA), Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara Telepon (0291)591125;

Fax. (0291)591724

Email: yason_lukman@yahoo.com

Abstract

A massive death of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone.) due to Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) infection has occurred in Indonesia recently and still cannot be eradicated efficiently. The fast reproduction of IMNV depends on the *RdRp* gene that encodes for RNA polymerase. Genetic characterization of IMNV *RdRp* gene from Indonesia is important in order to compare with other IMNV to find out genetic variation as a base for combating this virus. IMNV-infected vannamei were taken from major aquaculture region in Indonesia (Lampung, Gresik and Pontianak). RNA polymerase coding genes (12 and 13 region) from infected vannamei were amplified using RT-PCR with appropriate primer. Amplification products were sequenced and the results were analyzed using BioEdit 7.1.3.0, ClustalW2, CLC free workbench 6.6.2. and ClustalX programs. Results showed that homology value of IMNV *RdRp* gene from Lampung and Gresik were 98,04-99,58% compared with IMNV from Brazil (Acc. No. AY570982). Amino acid analysis revealed homology value of IMNV *RdRp* gene from Lampung and Gresik were 100% and 99,04% compared with IMNV from Brasil. IMNV *RdRp* gene from Pontianak cannot be analysed due to low quality of RNA.

Key words: vannamei, IMNV, RdRp, genetic characterization

Abstrak

Kematian massal udang vannamei (*Litopenaeus vannamei* Boone.) karena serangan *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) telah terjadi di Indonesia beberapa tahun terakhir ini dan belum dapat ditangani secara maksimal. Perkembangbiakan IMNV yang cepat, ditentukan oleh gen *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp) yang menyandi RNA polimerase. Karakterisasi genetik gen RdRp IMNV Indonesia berbasis urutan basa perlu dibandingkan dengan IMNV lain guna mengetahui variasi genetik gen tersebut sebagai dasar informasi untuk menangani virus. Sampel udang vannamei terinfeksi IMNV diambil dari daerah budidaya udang utama Indonesia, yaitu Lampung, Gresik, dan Pontianak. Sampel positif IMNV diampifikasi gen penyandi RNA polimerasinya pada daerah 12 dan 13 dengan metode RT-PCR menggunakan primer spesifik. Hasil amplifikasi disekuensing dan dianalisis dengan program BioEdit 7.1.3.0, ClustalW2, CLC free workbench 6.6.2. dan ClustalX. Hasil penelitian memperlihatkan karakter gen RdRp IMNV asal Lampung dan Gresik memiliki homologi basa sebesar 98,04-99,58% dengan IMNV asal Brazil (Acc. No. AY570982). Namun analisis asam amino memperlihatkan karakter gen RdRp IMNV asal Lampung dan Situbondo memperlihatkan homologi sebesar 100% dengan IMNV asal Brazil sebagai negara asal virus tersebut, sedangkan IMNV asal Gresik hanya 99,04%. Gen RdRp IMNV asal Pontianak belum dapat dianalisis karena kualitasnya kurang memenuhi untuk sekuensing.

Kata kunci : vannamei, IMNV, RdRp, karakterisasi genetik

PENDAHULUAN

Udang vannamei (*Litopenaeus vannamei* Boone.) merupakan udang air laut yang banyak dibudidayakan dan menjadi primadona di Indonesia. Produksi udang vannamei di Indonesia mengalami penurunan pada beberapa tahun terakhir ini. Hal ini disebabkan oleh serangan infeksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV). Virus ini telah menyerang udang vannamei pada beberapa provinsi di Indonesia termasuk Lampung, Jawa Timur, dan Kalimantan Barat (Taukhid & Nur'aini, 2008; Sinaro & Listianingsih, 2011; & NACA & FAO, 2011). Upaya pencegahan IMNV sudah dilakukan dengan pemberian imunostimulan dalam jumlah besar, tetapi kurang begitu efektif. Hal ini terjadi karena bervariasinya karakteristik IMNV dari berbagai daerah, termasuk di Indonesia.

Beberapa penelitian tentang karakterisasi genetik seluruh genom IMNV di beberapa negara telah dilakukan, namun pada penelitian ini lebih difokuskan pada sebagian fragmen gen penyandi RNA polimerase (daerah 12 dan 13). Fragmen gen penyandi RNA polimerase daerah 12 dan 13 masing-masing memiliki panjang 600 pb. Pemilihan fragmen gen ini disebabkan perannya yang sangat penting dalam proses replikasi virus sehingga termasuk dalam *conserved region*. Pengetahuan tentang karakteristik fragmen gen penyandi RNA polimerase ini menjadi sangat penting karena dapat dijadikan dasar dalam perancangan *RNA interference*, yaitu fragmen *double stranded RNA* yang digunakan untuk menghentikan ekspresi gen target untuk mencegah proses replikasi IMNV dalam udang vannamei (Senapin *et al.*, 2007, Fletcher & Rise, 2012).

Upaya karakterisasi genetik ini pernah dilakukan pada spesies udang vannamei yang ada di Situbondo, Jawa Timur oleh Senapin *et al.* (2007) dengan memakai metode *Reverse Transcription Polymerization Chain Reaction* (RT-PCR) dan sekuensing genom. Namun pengambilan sampel hanya dari satu daerah saja sehingga membuat hasil yang diperoleh kurang dapat menggambarkan karakteristik genetik IMNV dari Indonesia secara menyeluruh. Pemahaman

karakteristik IMNV di Indonesia secara total membutuhkan sampel udang dari beberapa daerah budidaya besar yang terserang virus tersebut antara lain Lampung, Gresik dan Pontianak, yang juga mewakili 3 pulau besar di Indonesia. Karakterisasi genetik dilakukan melalui perbandingan sekuen fragmen gen penyandi RNA polimerase IMNV asal Lampung, Gresik, dan Pontianak dengan sekuen IMNV dari *GenBank* asal negara lain yang udangnya juga terserang IMNV.

BAHAN DAN METODE

Materi penelitian adalah hasil isolasi RNA oleh Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara yang diperoleh dari sampel kaki renang dan insang dari udang *L. vannamei* yang menunjukkan tanda-tanda terinfeksi IMNV dari tambak di daerah Lampung, Gresik dan Pontianak dengan reagen Trizol. Sampel RNA dari daerah Gresik berumur kurang dari satu tahun. Sampel RNA dari Lampung dan Pontianak berumur lebih dari dua tahun. Reagensia yang digunakan antara lain 100 ng/μl primer ampikon 600 pb (F12, R12, F13, dan R13), 5X bufer PCR, campuran dNTP 10 mM, *Taq* DNA polimerase, *reverse transcriptase* AMV (2,5 U/μl), *RNase inhibitor*, MgCl₂, bufer *Tris Borate EDTA* (TBE) 0,5X, gel agarosa 1,5%, *loading buffer* 6X, penanda DNA K-180 100 pb *ladder*, *ethidium bromide* (5 μg/ml) dan akuades.

Fragmen gen RdRp IMNV daerah 12 dan 13 diamplifikasi dengan teknik RT-PCR dengan menggunakan metode dan primer yang dirancang oleh Senapin *et al.* (2007) berdasarkan sekuen genom IMNV (*GenBank* accession no. AY570982) (Tabel 1). Kedua fragmen tersebut masing-masing berukuran 600 pb. Dua daerah itu terletak pada rentang 5.280-5.880 pb (daerah 12) dan 5.760-6.360 pb (daerah 13). Hasil amplifikasi akan di"running" menggunakan elektroforesis dengan volume masing-masing sebanyak 1 ml. Fragmen gen selanjutnya divisualisasi di atas UV transiluminator dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi RdRp daerah 12 dan daerah 13

Daerah	Target (pb)	Sekuen <i>forward primer</i>	Sekuen <i>reverse primer</i>
12	600	5'-TTGTACAAAACA TTTGTATCTATAT-3'	5'-CTTCGATGTTAGA TGCCACAGCAAG-3'
13	600	5'-TTTATACACCGCA AGAATTGGCCAA-3'	5'-AGATTTGGGAGA TTGGGTCGTATCC-3'

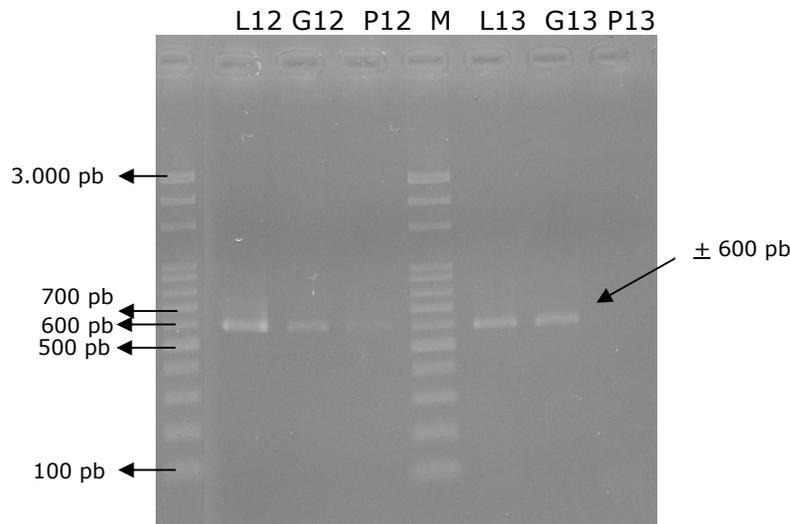
Hasil amplifikasi yang menunjukkan ampikon sebesar 600 pb saat visualisasi cDNA, disekuensing di 1st Base Pte Ltd, Singapura. Pembacaan hasil sekuensing dilakukan dengan program BioEdit 7.1.3.0. Setiap hasil sekuensing dipotong pada ujung-ujung baik 5' maupun 3' yang memiliki elektroferogram tidak stabil. Setiap hasil sekuensing daerah 12 dan 13 dari satu asal digabungkan. Sekuen digabungkan dengan sekuen yang terdapat pada *GenBank* dengan memakai program BLASTn. Setiap sekuen disejajarkan secara berpasangan (*pairwise alignment*) dengan sekuen *GenBank* yang memiliki tingkat kemiripan 90% agar diperoleh nilai homologinya. Setiap sekuen sampel dan sekuen dari *GenBank* disejajarkan secara bersama-sama (*multiple alignment*) untuk dibuat pohon fenetiknya menggunakan program ClustalX. Setiap sekuen nukleotida sampel bersama dengan sekuen *GenBank* diterjemahkan menjadi asam amino menggunakan program CLC *free workbench*

6.6.0., kemudian dilakukan proses analisis yang sama dengan sebelumnya untuk memperoleh nilai homologi dan pohon fenetiknya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketiga sampel vannamei yang positif terinfeksi IMNV menunjukkan fragmen *RNA dependent RNA polymerase* (RdRp) daerah 12 dan 13. Hasil elektroforesis dari amplifikasi ini dapat dilihat pada Gambar 1. Sampel IMNV asal Lampung dan Gresik memperoleh pita berukuran sekitar 600 pb.

Pada sampel IMNV asal Pontianak hanya daerah 12 saja yang mampu teramplifikasi dengan pita yang tipis, sedangkan daerah 13 tidak teramplifikasi. Hal ini mungkin dikarenakan hasil ekstraksi RNA sampel Pontianak telah rusak, sehingga tidak dapat teramplifikasi. Kerusakan RNA ini dimungkinkan, karena waktu penyimpanan yang terlalu lama, yaitu dua tahun.



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen RdRp IMNV daerah 12 dan 13.

Keterangan: L12 = sampel IMNV asal Lampung daerah 12

G12 = sampel IMNV asal Gresik daerah 12

P12 = sampel IMNV asal Pontianak daerah 12

M = marker DNA

L13 = sampel IMNV asal Lampung daerah 13

G13 = sampel IMNV asal Gresik daerah 13

P13 = sampel IMNV asal Pontianak daerah 13

Setiap sampel dapat disekuensing, kecuali sampel gen RdRp IMNV daerah 12 asal Pontianak karena pitanya yang terlalu tipis saat divisualisasi pada UV transiluminator. Pita yang tipis ini menunjukkan kualitas RNA dalam sampel gen RdRp IMNV daerah 12 asal Pontianak yang kurang memenuhi jumlah yang diperlukan untuk sekuensing.

Hasil BLASTn sekuen gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13 asal Lampung serta sekuen gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan

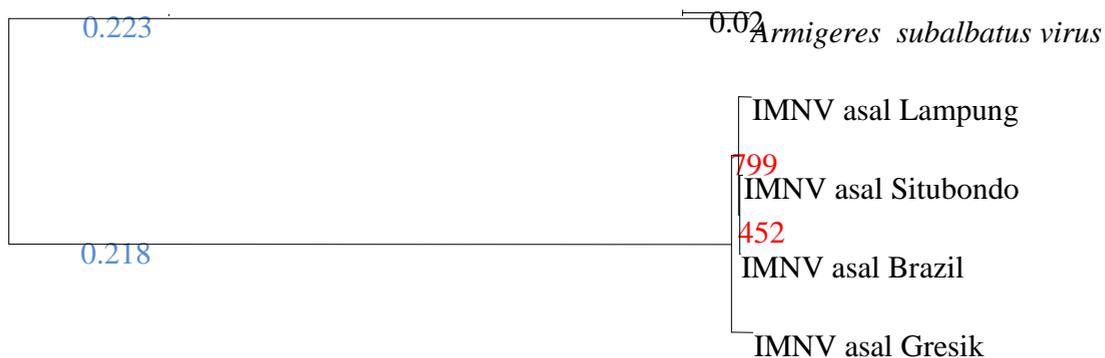
13 asal Gresik diperoleh dua sekuen yang memiliki tingkat kemiripan mencapai 99% dengan kedua sampel, yaitu sekuen IMNV asal Brazil dengan *accession no.* AY570982 dan IMNV asal Situbondo, Indonesia *accession no.* EF061744. Hasil penjajaran secara berpasangan (*pairwise alignment*) setiap sekuen sampel dengan sekuen *GenBank* menghasilkan data nilai homologi yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai homologi nukleotida gen RdRp IMNV daerah 12 dan 13 hasil *multiple pairwise alignment*.

IMNV	Gresik	Lampung	Brazil	Situbondo
Gresik	100%			
Lampung	98,73%	100%		
Brazil	99,26%	99,58%	100%	
Situbondo	99,15%	99,47%	99,89%	100%

Nilai homologi menunjukkan tingkat homologi (kesamaan) di dalam nukleotida antara dua sekuen yang disejajarkan. Berdasarkan data nilai homologi pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa semua pasang sekuen menunjukkan nilai di atas 90%. Sekuen IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo memiliki nilai homologi paling tinggi, yaitu 99,89%. Sekuen IMNV asal Lampung memiliki nilai homologi cukup tinggi dengan IMNV asal Brazil dan asal Situbondo dibandingkan sampel asal Gresik. Hal ini menandakan sekuen sampel Lampung lebih banyak kesamaannya secara fenotip (dari basa nitrogen) terhadap IMNV asal Brazil dan asal Situbondo dibandingkan dengan sampel Gresik.

Keseluruhan sekuen nukleotida disejajarkan (*multiple sequence alignment*) dengan penambahan *Armigeres subalbatus virus* sebagai *outgroup* untuk pembuatan pohon fenetik melalui bantuan program ClustalX. *Armigeres subalbatus virus* dipilih sebagai *outgroup*, karena masih tergolong dalam famili yang sama dengan IMNV, yaitu Totiviridae, sehingga masih berkerabat tapi jauh. Hasil penjajaran sekuen kemudian dibuat pohon fenetiknya dengan bantuan program yang sama. Rekonstruksi pohon fenetik ini menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan nilai *bootstrap* sebanyak 1000. Rekonstruksi pohon fenetik dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pohon fenetik nukleotida gen RdRp IMNV penggabungan daerah 12 dan 13 asal Lampung dan Gresik dibandingkan dengan IMNV asal Brazil, IMNV asal Situbondo dan *Armigeres subalbatus virus*. Keterangan : Angka berwarna merah menunjukkan nilai *bootstrap* dan angka berwarna biru menunjukkan panjang cabang.

Hasil rekonstruksi pohon fenetik yang menunjukkan tingkat kesamaan secara fenotip pada gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13. IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo memiliki tingkat kesamaan yang paling tinggi sehingga kedua sekuen ini terletak pada satu kelompok monofenetik dan memiliki nilai *bootstrap* sebesar 452. Nilai 452 ini menandakan jika dilakukan pengulangan secara acak dengan 1000 kali ulangan akan diperoleh hasil yang sama sebanyak 452 kali seperti hasil pohon fenetik di atas. Gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13 asal Lampung memiliki kesamaan fenotip yang lebih dekat terhadap pasangan IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo. Tingkat kesamaan ini

juga tergambar dari nilai homologinya dibandingkan dengan sampel asal Gresik. *Armigeres subalbatus virus* merupakan *outgroup* dan memiliki tingkat homologi paling rendah sehingga terletak di kelompok polifenetik.

Sekuen nukleotida gen RdRp gabungan daerah 12 dan 13 di atas juga diubah menjadi urutan asam amino. Proses ini dilakukan untuk lebih menegaskan atau meyakinkan tingkat keabsahan hasil dari pengolahan data nukleotida. Urutan asam amino sampel maupun IMNV dari *GenBank* disejajarkan secara berpasangan (*pairwise alignment*) dan menghasilkan nilai homologi yang dapat dilihat pada Tabel 3. di bawah ini.

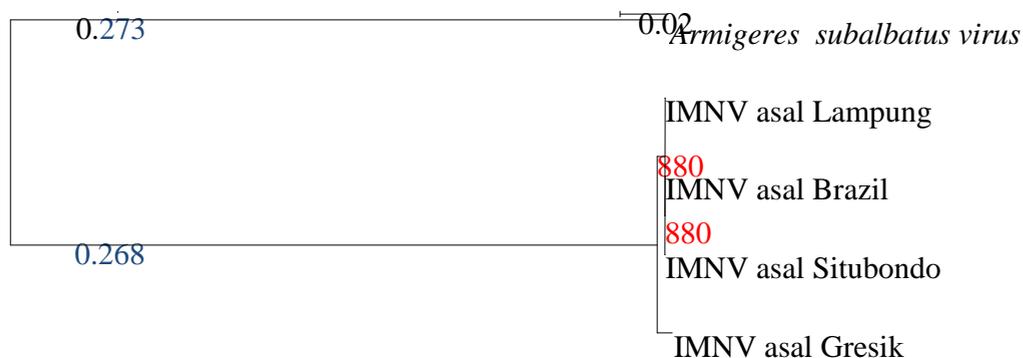
Tabel 3. Nilai homologi asam amino gen RdRp IMNV daerah 12 dan 13 hasil *multiple pairwise alignment*.

IMNV	Gresik	Lampung	Brazil	Situbondo
Gresik	100%			
Lampung	99,04%	100%		
Brazil	99,04%	100%	100%	
Situbondo	99,04%	100%	100%	100%

Berdasarkan data nilai homologi pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa sekuen IMNV asal Brazil – IMNV asal Situbondo, IMNV asal Lampung – IMNV asal Brazil, dan IMNV asal Lampung – IMNV asal Situbondo memiliki nilai homologi tertinggi, yaitu 100%. Nilai homologi sebesar 100% menunjukkan sekuen asam amino yang dibandingkan tidak ada perbedaan. Sekuen asal Gresik memiliki nilai homologi yang tinggi baik dengan sekuen IMNV asal Lampung, IMNV asal

Brazil, maupun IMNV asal Situbondo sebesar 99,04%. Hal ini menandakan sekuen IMNV asal Lampung homolog dengan IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo dibandingkan dengan sampel Gresik.

Keseluruhan sekuen asam amino disejajarkan (*multiple sequence alignment*) untuk pembuatan pohon fenetik Hasil rekonstruksi pohon fenetik dapat dilihat pada Gambar 3. di bawah ini.



Gambar 3. Pohon fenetik asam amino gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13 asal Lampung dan Gresik dibandingkan dengan IMNV asal Brazil, IMNV asal Situbondo dan *Armigeres subalbatus virus*. Keterangan : Angka berwarna merah menunjukkan nilai *bootstrap* dan angka berwarna biru menunjukkan panjang cabang.

Hasil rekonstruksi pohon fenetik menunjukkan tingkat kesamaan secara fenotip pada asam amino gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13. IMNV asal Lampung, IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo memiliki tingkat kesamaan yang paling tinggi, sehingga ketiga sekuen ini terletak pada satu kelompok monofenetik dan memiliki nilai *bootstrap* sebesar 880. Asam amino dari gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13 asal Gresik memiliki kesamaan fenotip yang lebih dekat terhadap ketiga IMNV lainnya dengan nilai *bootstrap* sebesar 880.

Berdasarkan analisis nilai homologi dan pohon fenetik baik dari sekuen nukleotida maupun asam amino dari gen RdRp IMNV gabungan daerah 12 dan 13 dapat disimpulkan bahwa sekuen asal Lampung memiliki tingkat variasi genetik yang lebih rendah daripada sekuen asal Gresik. Hal ini dapat dilihat secara nyata dari nilai homologi sekuen nukleotida Lampung yang lebih tinggi dari sekuen Gresik, serta nilai homologi sekuen asam amino Lampung yang mencapai nilai 100% terhadap IMNV asal Brazil maupun Situbondo. Hal ini menunjukkan sekuen Lampung

lebih *conserved* dibanding sekuen Gresik. Meskipun dilihat dari nukleotidanya tampak terjadi perubahan pada beberapa basa nitrogen dari sekuen Lampung, namun asam amino yang dihasilkan sama persis dengan IMNV asal Brazil dan IMNV asal Situbondo.

Pada dasarnya nilai homologi, baik sekuen IMNV asal Lampung maupun Gresik yang tinggi mencapai 90% ke atas menunjukkan tingkat *conserved* yang tinggi dengan sekuen IMNV dari *GenBank* yang berasal dari Brazil. Hal ini disebabkan karena IMNV yang menginfeksi udang vannamei di Indonesia berasal dari Brazil yang sampai ke Indonesia melalui proses impor udang vannamei (Senapin *et al.*, 2007).

Tingkat variasi genetik dari IMNV asal Gresik yang lebih tinggi diduga disebabkan, karena terjadinya mutasi pada saat replikasi virus. Mutasi dapat terjadi karena virus RNA tidak memiliki sistem pengecekan (*proofreading*), sehingga kesalahan dalam replikasi genom pada virus tidak diperbaiki dan berakibat tingginya laju mutasi (Campbell *et al.*, 2010). Selain itu, sampel vannamei yang terinfeksi IMNV dari Gresik ini diambil dari petambak lokal, bukan dari balai pembenihan seperti sampel asal Lampung. Hal ini sangat berpengaruh khususnya perbedaan faktor fisik seperti kualitas air, temperatur, maupun media pembudidayaan dari kedua lokasi tersebut. Faktor fisik pada balai pembenihan, jauh lebih terjaga daripada dari tambak lokal, sehingga kemungkinan virus bermutasi akibat faktor fisik di balai pembenihan jauh lebih rendah dibandingkan dengan tambak lokal.

Data yang diperoleh dari penelitian ini lebih komprehensif dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Senapin *et al.* (2007), yaitu diperolehnya data sekuen IMNV yang lebih banyak karena sampel diambil dari 3 daerah di Indonesia, sedangkan Senapin *et al.* (2007) hanya mengambil data dari daerah Situbondo saja. Pengambilan sampel dari daerah yang lebih beragam ini akan lebih dapat memberikan gambaran secara lebih utuh mengenai sekuen IMNV dari Indonesia, dibandingkan jika mengambil dari satu daerah saja, meskipun sekuen yang diperoleh bukanlah keseluruhan genom IMNV.

Tingkat *conserved* yang tergolong tinggi (>90 %) pada gen RdRp ini dapat dijadikan indikasi dalam membuat RNAi untuk menghambat pembentukan RNA polimerase yang berperan dalam replikasi virus IMN dari daerah manapun di Indonesia.

KESIMPULAN

Fragmen gen penyandi RNA polimerase (RdRp) IMNV daerah 12 dan 13 asal Lampung dan Gresik memiliki karakteristik fragmen yang mirip dengan IMNV asal Situbondo dan Brazil. Hal ini dapat dilihat dari nilai homologi >90 dan kedekatan pada pohon fenetik yang terbentuk. Fragmen gen penyandi RNA polimerase IMNV asal Pontianak daerah 12 tidak dapat disekuen, sedangkan daerah 13 tidak dapat teramplifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu drh. Ch. Retna Handayani, M.Si selaku kepala laboratorium MKHA & penyelia lab. Biologi Molekuler BBPBAP Jepara; Ibu Rahayu Rahardianti & Ibu Evy Maftuti Nur selaku teknisi Lab MKHA dan semua pihak atas dukungan dan bimbingannya yang diberikan dalam penulisan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Tauhid & Y. L. Nur'aini. 2008. Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) In Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* In Indonesia. Indonesian Aquaculture Journal. 3(2): 139-146.
- Sinaro, S. D. & W. Listianingsih. 2011. Liputan Khusus : Waspada! Myo Makin Meluas. <http://www.agrina/redesign2.com>. 21 April 2012.
- NACA & FAO. 2011. Quarterly Aquatic Animal Disease Report. NACA. Bangkok.
- Senapin, S., K. Phewsaiya, M. Briggs, & T. W. Flegel. 2007. Outbreaks Of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) In Indonesia Confirmed by Genom Sequencing and Use Of An Alternative RT-PCR Detection Method. Science Direct Aquaculture. 266: 32-38.

Fletcher, G. L. & M. L. Rise. 2012. *Advanced in Genomics and Genetics of Penaeid Shrimp*. John Wiley & Sons, Ltd., U.K.

Chambell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, &

R. B. Jackson. 2010. *Biologi*. Edisi 8. Jilid 1. Erlangga, Jakarta.