

Efikasi vaksin DNA penyandi glikoprotein koi herpesvirus GP-25 pada ikan mas stadia benih melalui perendaman

Efficacy of DNA vaccine encoding koi herpesvirus glycoprotein GP-25 in common carp juvenile by immersion

Soko Nuswantoro^{*1}, Alimuddin^{**2}, Munti Yuhana², Ayi Santika³, Sri Nuryati², Zakki Zainun³, Mira Mawardi³

¹ Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145

² Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

³ Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar, Sukabumi.
Jl. Selabintana No. 37 Sukabumi 43114

*email: noxoz1st@yahoo.co.id, **email: alimuddin_alsani@yahoo.com

ABSTRACT

Koi herpesvirus (KHV) is a herpesvirus that particularly infects and causes mass mortality to koi and common carp. Therefore, the protection of common carp from KHV infection is urgently needed. In this study, we developed an application of DNA vaccine encoding KHV glycoprotein-25 by immersion method to increase survival of common carp against KHV infection. A total of 400 common carp juveniles at 30-day-old were immersed in 1-L water containing 1.3×10^8 CFU/mL of the killed *Escherichia coli* cells carrying DNA vaccine. Three frequencies and three duration of fish immersion were tested, namely: 1×30 minutes, 1×60 minutes, 1×90 minutes, 2×90 minutes and 3×90 minutes by interval of 24 hours. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis showed that DNA vaccine was successfully expressed in the vaccinated fish. Fish at twenty eight days post vaccination were challenged by injecting 10^{-4} mL of KHV per fish. The result showed that vaccination by 1×30 minutes immersion allowed 61% of fish survived, and this was significantly higher ($p < 0.05$) compared to control (without vaccination), but it was similar among vaccination treatments ($p > 0.05$). The relative percent survival of vaccinated fish were also similar among treatments ($p > 0.05$). DNA vaccination has increased fish survival about two fold higher compared to unvaccinated fish control (26.67%). Thus, DNA vaccination was effectively delivered by immersion for 1×30 minutes, and this technique can be useful to level up the resistance of common carp juveniles against KHV infection.

Keywords: DNA vaccine, KHV, glycoprotein, immersion, common carp

ABSTRAK

Koi herpes virus (KHV) adalah virus herpes yang hanya menginfeksi dan dapat menyebabkan kematian massal pada ikan koi dan mas. Oleh karena itu perlindungan ikan mas dari infeksi KHV sangatlah dibutuhkan. Dalam penelitian ini dikembangkan suatu aplikasi dari vaksin DNA penyandi glikoprotein KHV melalui metode perendaman untuk meningkatkan kelangsungan hidup ikan mas terhadap infeksi KHV. Sebanyak 400 ekor benih ikan mas berusia 30 hari direndam dalam air yang mengandung $1,3 \times 10^8$ sel/mL sel bakteri *Escherichia coli* mati yang membawa vaksin DNA. Tiga frekuensi dan tiga lama perendaman ikan diuji, yaitu 1×30 menit, 1×60 menit, 1×90 menit, 2×90 menit, dan 3×90 menit dengan selang waktu antar perendaman 24 jam. Analisis *reverse transcription polymerase chain reaction* menunjukkan bahwa vaksin DNA berhasil terekspresi pada ikan yang divaksin. Setelah 28 hari vaksinasi, ikan diuji tantang dengan menginjektikan KHV sebanyak 10^{-4} mL per ikan. Hasil uji tantang menunjukkan bahwa vaksinasi satu kali selama 30 menit memberikan kelangsungan hidup ikan 61%, dan berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol (tanpa vaksin), tetapi kelangsungan hidup ikan antar perlakuan vaksinasi adalah sama ($p > 0,05$). Kelangsungan hidup relatif ikan antar perlakuan vaksinasi juga tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Vaksinasi DNA meningkatkan kelangsungan hidup sekitar dua kali lebih tinggi dibandingkan ikan kontrol yang tidak divaksin (26,67%). Dengan demikian, vaksinasi DNA efektif dilakukan melalui satu kali perendaman selama 30 menit, dan teknik ini sangat berguna untuk meningkatkan ketahanan benih ikan mas terhadap infeksi KHV.

Kata kunci: vaksin DNA, KHV, glikoprotein, perendaman, ikan mas

PENDAHULUAN

Penyakit KHV sangat menular dan dapat menyebabkan kematian massal mencapai 85–100% (Sunarto & Cameron, 2006). Beberapa metode pernah dicoba untuk menanggulangi serangan dari KHV ini, antara lain dengan menjaga suhu air agar tetap hangat di atas 30 °C (Ronen *et al.*, 2003), karena pada umumnya serangan KHV terjadi pada saat suhu perairan berkisar antara 22–27 °C (Gilad *et al.*, 2003). Cara ini dinilai kurang efektif, karena sulit menjaga suhu perairan untuk tetap hangat bila budidaya dilakukan di perairan terbuka. Meskipun penjagaan suhu perairan dapat dilakukan, hal tersebut hanya bersifat sementara, sehingga KHV kembali menyerang bila suhu turun di kisaran ideal untuk KHV (Hartman *et al.*, 2008).

Melalui perlakuan vaksinasi, ikan dapat dirangsang untuk memproduksi antibodi yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh ikan. Hanya saja, penggunaan salah satu jenis vaksin, yaitu vaksin yang berasal dari virus yang diinaktivasi selalu menemui kegagalan (Illouze *et al.*, 2006). Jenis vaksin lainnya adalah vaksin DNA. Vaksin DNA yang berbentuk plasmid DNA bersifat sederhana, sehingga mudah terserap ke dalam sel ikan yang divaksinasi. Vaksin tersebut berfungsi sebagai mediator ekspresi glikoprotein virus, dapat mengaktifkan sistem kekebalan sesaat ataupun yang bersifat seluler, dapat mengombinasikan beberapa gen penyandi untuk menanggulangi beberapa patogen, bersifat aman, dan dapat diberikan pada stadia awal (Lorenzen & LaPatra, 2005).

Vaksin DNA penyandi glikoprotein-25 (GP-25) dari KHV yang telah diuji efikasinya melalui injeksi secara intramuskular (Nuryati *et al.*, 2010) digunakan pada penelitian ini. Selanjutnya, dengan pertimbangan praktis aplikasi vaksin DNA oleh pembudidaya, maka perlu dikembangkan metode vaksinasi secara massal. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan vaksinasi melalui perendaman sebagai salah satu metode vaksinasi massal. Teknik perendaman dipilih karena memungkinkan untuk ikan yang berukuran

kecil, jumlah banyak, dan tingkat stres pada ikan relatif rendah (Ellis, 1989). Tujuan dari penelitian ini adalah menguji metode penerapan vaksin DNA pada stadia ikan yang lebih kecil, karena jumlah penelitian yang mengarah ke vaksinasi massal pada ikan stadia kecil belum banyak yang berhasil.

BAHAN DAN METODE

Perbanyakan vaksin DNA

Bakteri *Escherichia coli* mengandung vaksin DNA pAct-GP-25 diperbanyak dalam media 2×YT pada suhu inkubasi 37 °C selama 16–20 jam (Nuryati *et al.*, 2010). Sel bakteri dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama sepuluh menit. Setelah media kultur dibuang, sel bakteri dicuci satu kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Kepadatan bakteri diukur menggunakan spektrofotometer hingga didapat *optical density* 1–1,5 pada panjang gelombang 600 nm. Sel bakteri diencerkan dengan PBS sehingga kepadatannya menjadi 10⁸ sel/mL, kemudian disimpan dalam *deep-freezer* -80 °C hingga digunakan.

Vaksinasi dan pemeliharaan ikan

Larva ikan mas berumur lima hari dipelihara secara terkontrol di akuarium berukuran 60×50×40 cm³ selama 25 hari. Sebanyak 400 ekor benih ikan mas berumur 30 hari direndam dalam air 1 L berisi bakteri yang telah dimatikan sebanyak 1,3×10⁸ sel/mL. Bakteri mengandung vaksin DNA dinonaktifkan dengan cara merendamnya dalam air bersuhu 85 °C selama 15 menit. Benih ikan mas direndam satu kali selama 30, 60, dan 90 menit. Air perendaman diberi aerasi untuk menjaga kadar oksigen terlarut dalam air tetap tinggi. Untuk perlakuan lama perendaman 90 menit, juga dibuat perlakuan frekuensi perendaman dua dan tiga kali dengan selang waktu antar perendaman adalah 24 jam.

Ikan mas yang telah divaksinasi dipelihara di dalam akuarium berukuran 60×50×40 cm³ dengan suhu air 29±1 °C, dilengkapi dengan aerasi dan air diganti sebanyak 75% dengan frekuensi tiga kali seminggu. Hingga berumur 30 hari, ikan diberi pakan berupa cacing sutera tiga kali sehari hingga ikan

kenyang, kemudian dilanjutkan hingga ikan berumur 60 hari menggunakan pakan komersial hingga ikan kenyang.

Verifikasi vaksin DNA GP-25

Setelah 24 jam pasca-vaksinasi, sampel ikan seberat 25–50 mg diambil untuk dilakukan verifikasi DNA. DNA diekstraksi menggunakan DNAzol (Invitrogen, USA) dengan prosedur sesuai manual. Sampel dihomogenisasi dalam DNAzol menggunakan *pestle*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama lima sampai sepuluh menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru, ditambahkan 0,5 mL etanol absolut, dan kemudian dihomogenisasi dengan dibolak-balik. Tabung disimpan secara vertikal selama satu menit agar DNA mengendap di dasar tabung, kemudian tabung disentrifugasi lagi pada 10.000 rpm selama satu sampai dua menit pada suhu ruang. Pelet DNA dicuci sebanyak dua kali dengan menambahkan 1 mL etanol 75%, dibolak-balik, disimpan secara vertikal selama satu menit, dan selanjutnya disentrifugasi pada 10.000 rpm selama satu sampai dua menit pada suhu ruang. Etanol dibuang, kemudian tabung dikeringudarkan selama satu menit. DNA dilarutkan dengan air destilasi steril.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan PCR. Primer yang digunakan merupakan primer yang konstruksinya didesain oleh Octavera (komunikasi pribadi), yaitu forward F-GP-25 5'-TTGTCGACATG-ACGGGTTGTGGGGTTTG-3' dan reverse R-GP-25 5'-CCTCAGCAAGGCG-GCCTTAC-3'. Reaksi PCR dilakukan menggunakan *Pure Taq Ready-To-Go-PCR Beads* (GE Healthcare, UK) dengan prosedur sesuai manual. Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama tujuh menit; 45 siklus pada suhu 94 °C selama 30 detik, 64 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 30 detik; serta suhu 72 °C selama tujuh menit. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7% (w/v). Sebagai kontrol internal digunakan primer KHV (Yuasa *et al.*, 2005). Pengambilan sampel untuk verifikasi DNA dilakukan kembali setelah 14 hari dan 28 hari

pasca-vaksinasi.

Analisis ekspresi mRNA GP-25

Analisis ekspresi mRNA dilakukan 24 jam setelah vaksinasi. Isolasi RNA total dilakukan menggunakan *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, USA) dengan prosedur sesuai manual. Sampel untuk ekstraksi diambil sekitar 30 mg, ditambahkan 600 µL *buffer* RLT yang sebelumnya telah ditambahkan β-merkaptotanol, dihomogenisasi dengan menggunakan *pestle*, dilakukan di atas es. Tabung disentrifugasi selama tiga menit pada 10.000 rpm. Dengan hati-hati supernatan dipindahkan dengan pipeting ke dalam tabung mikrosentrifugasi baru. Etanol 70% ditambahkan sebanyak 600 µL untuk membersihkan larutan, dan dihomogenkan menggunakan mikropipet. Larutan dipindahkan sebanyak 700 µL ke dalam *RNeasy spin column*, dan tabung koleksi 2 mL dipasang untuk menampung larutan yang terbuang. Tabung ditutup rapat dan disentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm. Larutan yang menembus *filter spin column* dibuang. *Buffer* RW1 ditambahkan sebanyak 700 µL. Tabung ditutup rapat dan disentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm. Larutan yang menembus *filter spin column* dibuang kembali. *Buffer* RPE ditambahkan sebanyak 500 µL. Tabung ditutup rapat dan disentrifugasi selama 15 detik pada 10.000 rpm. Larutan yang menembus *filter spin column* dibuang kembali, dan *buffer* RPE ditambahkan sebanyak 500 µL. Tabung ditutup rapat dan disentrifugasi selama dua menit pada 10.000 rpm. Larutan yang menembus *filter spin column* dibuang kembali. *RNeasy spin column* dipindahkan ke dalam tabung koleksi baru, ditambahkan 50 µL air bebas RNase. Tabung ditutup rapat, dan disentrifugasi selama satu menit pada 10.000 rpm untuk melarutkan RNA.

Analisis ekspresi mRNA dilakukan menggunakan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Primer yang digunakan merupakan primer GP-25 sama dengan yang digunakan dalam deteksi vaksin DNA menggunakan metode PCR. *One Step RT-PCR* (Qiagen, USA) digunakan untuk reaksi RT-PCR dengan prosedur sesuai

manual. Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: *reverse transcriptase* pada suhu 50 °C selama 30 menit; pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 15 menit; 35 siklus pada suhu 94 °C selama 30 detik, 64 °C selama 30 detik dan 72 °C selama satu menit; serta suhu 72 °C selama sepuluh menit. Sampel PCR disimpan terlebih dahulu di atas es, kemudian dimasukkan ke dalam mesin setelah mesin PCR mencapai suhu 50 °C. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (W/V). Pengambilan sampel untuk uji ekspresi mRNA dilakukan kembali setelah 14 hari dan 28 hari setelah vaksinasi.

Uji tantang dengan virus KHV

Filtrat virus KHV diisolasi dari insang beberapa ekor ikan mas yang terserang KHV berasal dari Waduk Cirata, Kabupaten Cianjur, Insang sebanyak 1 g digerus menggunakan mortar, diencerkan dengan PBS hingga 10 mL, dan kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 5 °C. Hasil gerusan disaring dengan kertas saring ukuran pori, dan hasil penyaringan selanjutnya dijadikan stok sebanyak 10^{-1} . Stok filtrat virus diencerkan hingga 10^{-3} untuk uji tantang.

Ikan diuji tantang dengan menyuntikkan filtrat KHV secara intra muskular sebanyak 0,1 mL dari stok filtrat 10^{-3} . Ikan dipelihara selama 21 hari di dalam akuarium ($60 \times 50 \times 40 \text{ cm}^3$) yang diberi aerasi, dengan kepadatan 30 ekor. Penggantian air dilakukan sebanyak 75% bagian, setiap dua hari sekali. Ikan diberi pakan komersial sebanyak dua kali sehari hingga ikan kenyang; pada pagi, dan sore hari. Ikan yang mati dicatat setiap hari.

Pada akhir periode uji tantang, sampel ikan diambil untuk memastikan terserang KHV. Metode ekstraksi DNA seperti dijelaskan sebelumnya. Sebagai data pendukung, dilakukan juga pembuatan preparat histologi insang dari ikan pasca uji tantang setiap minggu dan setiap perlakuan dengan prosedur pembuatan preparat histologi modifikasi dari Mumford (2004).

Parameter uji

Hasil pencatatan ikan yang mati tiap hari akan digunakan dalam perhitungan parameter

uji. parameter yang diuji pada penelitian ini adalah kelangsungan hidup dan tingkat kelangsungan hidup relatif. Tingkat kelangsungan hidup dihitung berdasarkan persamaan yang ditulis oleh Zonneveld *et al.* (1991), sedangkan tingkat kelangsungan hidup relatif dihitung berdasarkan persamaan yang tercantum dalam Ellis (1988).

Analisis statistik

Data dianalisis menggunakan uji sidik ragam dengan bantuan program SPSS ver 19.0. Uji lanjut dilakukan menggunakan uji Duncan pada $p < 0,05$.

HASIL

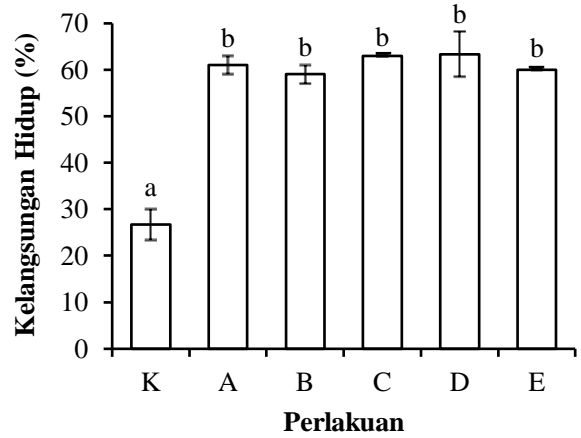
Kelangsungan hidup

Tingkat kelangsungan hidup benih ikan mas yang diberi vaksin DNA berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kontrol yang tidak diberi vaksin (Gambar 1). Sedangkan kelangsungan hidup ikan yang diberi vaksin dengan lama perendaman berbeda adalah tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Kelangsungan hidup ikan mas yang divaksin berkisar antara 59–63%, sedangkan kontrol adalah 26,67%. Kelangsungan hidup benih ikan mas yang divaksin dengan frekuensi berbeda (satu, dua, dan tiga kali) adalah tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), berkisar antara 60,00–63,33% (Gambar 1), dan lebih tinggi daripada kontrol. Selanjutnya, nilai kelangsungan hidup relatif/RPS (Gambar 2) ikan yang diberi vaksin adalah sama ($p > 0,05$).

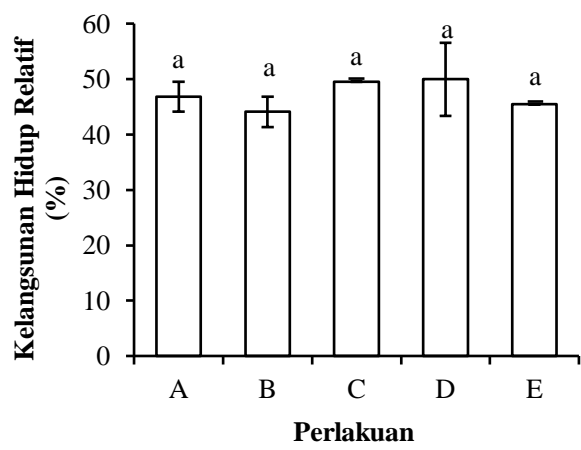
Verifikasi DNA, dan uji ekspresi mRNA GP-25

Verifikasi DNA GP-25 dilakukan untuk memastikan bahwa vaksin DNA masuk dan diserap oleh organ target. Seperti ditunjukkan pada Gambar 3A, semua sampel dari perlakuan yang berbeda (A–E) hingga hari ke-28 mempunyai produk PCR yang sama ukurannya dengan kontrol positif (K+), sedangkan ikan kontrol tanpa vaksinasi (K) tidak menunjukkan adanya pita DNA produk PCR. DNA template dari ikan yang divaksin dan kontrol dalam proses PCR ada pada semua perlakuan (Gambar 3C). Selanjutnya, PCR menggunakan primer deteksi virus KHV tidak memperlihatkan produk PCR

pada ikan yang divaksin dan kontrol (K) (Gambar 3B), hanya terdapat pada kontrol positif (K+). Hal tersebut menunjukkan bahwa pita DNA produk PCR pada Gambar 3A adalah benar DNA vaksin, bukan karena ikan mas terinfeksi oleh KHV.



Gambar 1. Kelangsungan hidup ikan mas yang diberi vaksin DNA GP-25 melalui perendaman dengan lama waktu berbeda. K (kontrol), A (1×30 menit), B (1×60 menit), C (1×90 menit), D (2×90 menit), E (3×90 menit). Huruf yang berbeda di atas balok pada diagram batang menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

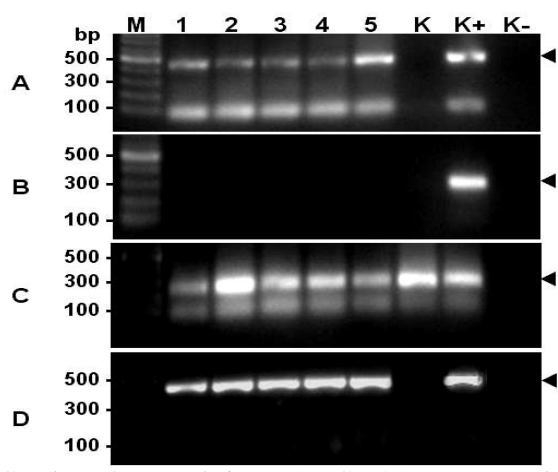


Gambar 2. Kelangsungan hidup relatif ikan mas yang divaksin DNA GP-25 dengan lama dan frekuensi berbeda terhadap kontrol, A (1×30 menit), B (1×60 menit), C (1×90 menit), D (2×90 menit), E (3×90 menit). Huruf yang sama di atas balok pada diagram batang menunjukkan tidak ada pengaruh yang berbeda nyata ($p > 0,05$).

Uji ekspresi mRNA GP-25 dilakukan untuk memastikan bahwa GP-25 diekspresikan di dalam tubuh ikan mas. Seperti ditunjukkan pada Gambar 3D, ekspresi mRNA GP-25 terdeteksi pada semua perlakuan vaksinasi hingga hari ke-28.

Histopatologi

Pengamatan pada preparat histopatologi menunjukkan bahwa pada ikan kontrol tanpa vaksin mengalami kerusakan yang lebih parah bila dibandingkan dengan ikan yang divaksin, ditandai dengan banyak sel yang mengalami hiperplasia, fusi lamela dari pangkal lamela hingga hampir menyeluruh ke ujung lamela, dan terdapat beberapa badan inklusi sebagai ciri khas kerusakan jaringan yang disebabkan oleh serangan virus (Gambar 4). Sementara itu, ikan yang divaksin memiliki kerusakan yang relatif lebih ringan, hanya mengalami hiperplasia ringan (Gambar 5). Pada ikan sehat tidak terlihat adanya kerusakan-kerusakan yang disebabkan oleh serangan dari KHV.



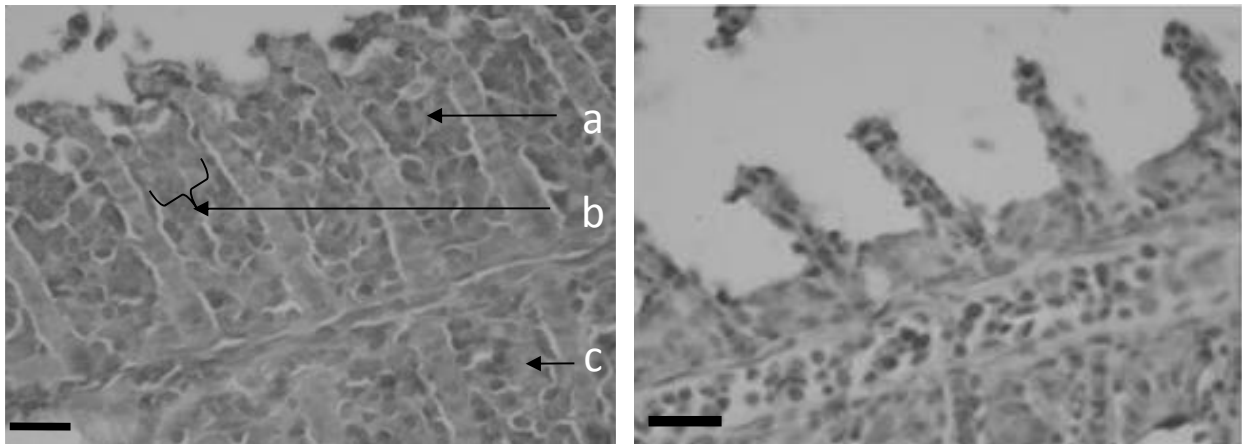
Gambar 3. Deteksi DNA GP-25 menggunakan metode PCR dengan cetakan DNA dari insang ikan mas dan primer spesifik GP-25 (A), verifikasi status ikan mas terhadap infeksi virus KHV menggunakan primer spesifik KHV (B), produk PCR menggunakan primer β-aktin ikan mas (C) sebagai *control template* DNA, dan ekspresi mRNA GP-25 pada ikan mas yang telah divaksin dengan lama waktu, dan frekuensi berbeda (D). DNA dan RNA total diekstraksi dari insang ikan mas pada hari ke-28 pasca vaksinasi. M: marker DNA, vaksinasi 1×30 menit (1), vaksinasi 1×60 menit (2), vaksinasi 1×90 menit (3), vaksinasi 2×90 menit (4), vaksinasi 3×90 menit (5), ikan kontrol tanpa perlakuan vaksinasi (K), kontrol positif PCR (K+), kontrol negatif PCR tanpa cetakan DNA (K-). Angka di sebelah kiri gambar adalah ukuran fragmen DNA marker. Tanda kepala panah di sebelah kanan gambar adalah target produk amplifikasi PCR.

PEMBAHASAN

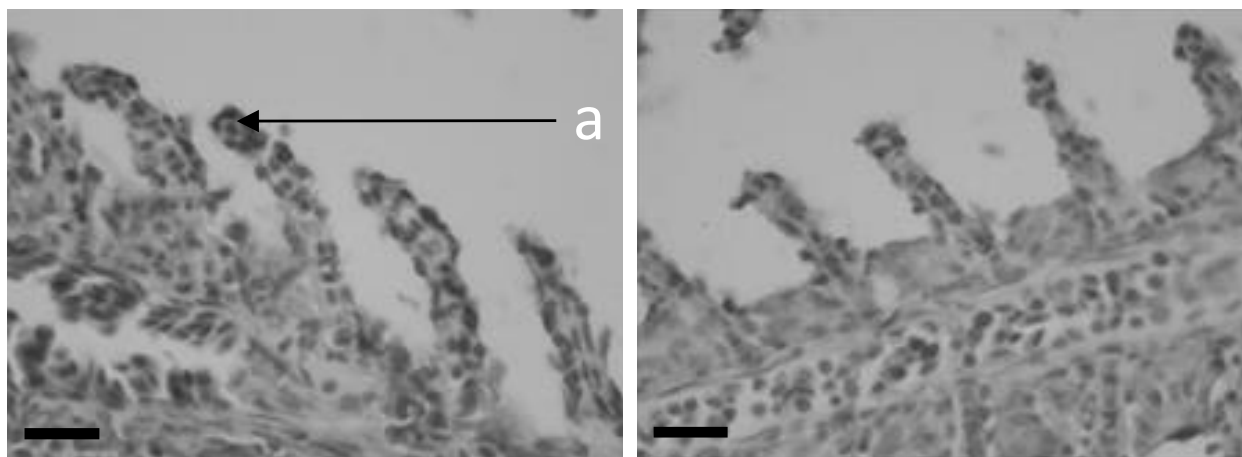
Vaksinasi benih ikan mas usia 30 hari melalui perendaman bakteri *E. coli*

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber.

© Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang



Gambar 4. Gambaran histopatologi insang ikan mas kontrol terinfeksi KHV hari ke-14 (kiri). Terdapat beberapa gejala insang ikan terserang KHV, antara lain: hiperplasia (a); fusi lamella (b); badan inklusi (c). Gambaran histologi insang ikan sehat tanpa infeksi KHV (kanan); bar: 8,33 μm .



Gambar 5. Gambaran histopatologi insang ikan mas perlakuan terinfeksi KHV ringan hari ke-14 (kiri). Terdapat beberapa gejala insang ikan terserang KHV ringan, yaitu hiperplasia ringan (a). Gambaran histologi insang ikan sehat tanpa infeksi KHV (kanan); bar: 8,33 μm .

mengandung vaksin DNA GP-25 inaktif terbukti dapat memberikan kekebalan terhadap infeksi virus KHV. Hal ini dibuktikan dengan nilai kelangsungan hidup berkisar 59–63%; 2,2–2,4 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ikan kontrol tanpa divaksin (26,67%). Kelangsungan hidup ikan divaksin melalui perendaman 30 menit tidak berbeda ($p > 0,05$) dengan 60, dan 90 menit. Dengan demikian vaksinasi DNA melalui perendaman dapat meningkatkan daya tahan ikan mas terhadap infeksi KHV, dan vaksinasi cukup dilakukan selama 30 menit. Nilai kelangsungan hidup ikan yang divaksin dua dan tiga kali adalah sama dengan yang divaksin sekali. Hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi DNA cukup dilakukan sekali saja dengan perendaman selama 30 menit. Lama perendaman hasil penelitian ini sama dengan yang dilaporkan oleh Corbeil *et al.* (2000a) dalam vaksinasi benih ikan salmon, yaitu

lama perendaman selama 30 menit.

Jumlah bakteri yang mengandung vaksin pada penelitian ini adalah $1,3 \times 10^8$ sel/mL. Dosis ini lebih besar bila dibandingkan dengan dosis yang digunakan oleh Corbeil *et al.* (2000a) yang menggunakan dosis bakteri sebesar $3,4 \times 10^6$ sel/mL. Penurunan dosis vaksin DNA KHV memungkinkan untuk dilakukan, seperti yang digunakan oleh Corbeil *et al.* (2000b) yang menggunakan vaksin plasmid DNA ipIHNw-G dengan dosis rendah sebesar 1–10 ng per ikan mampu memberikan perlindungan pada benih ikan *rainbow trout* terhadap IHNW WRAC strain heterolog.

Hasil perhitungan *relative percent survival* (RPS) antara kelompok ikan perlakuan vaksinasi dengan ikan kontrol menunjukkan hanya satu perlakuan yang nilai RPS mencapai 50% (2×90 menit), akan tetapi hasil RPS antar perlakuan tidak berbeda

nyata ($p>0,05$). Secara umum, nilai RPS yang baik adalah lebih dari 60% (Armend, 1981). Namun demikian, Costa *et al.* (2011) menyatakan bahwa meskipun nilai RPS kurang dari nilai standar umum, vaksinasi dikatakan efektif bila dapat memberikan pengaruh nyata dibandingkan dengan ikan yang tidak divaksin.

Nilai RPS yang dilaporkan oleh Nuryati *et al.* (2010) dan Khodijah (2012) juga lebih besar dibandingkan dengan penelitian ini. Ikan mas yang digunakan oleh Nuryati *et al.* (2010) dan Khodijah (2012) adalah sekitar 10 g/ekor, sedangkan pada penelitian ini menggunakan benih ikan mas 0,1 g/ekor. Perbedaan nilai RPS tersebut diduga berkaitan dengan perkembangan kemampuan ikan dalam merespons serangan penyakit dan memproduksi antibodi. Semakin besar ukuran ikan, maka akan semakin besar kemampuan ikan tersebut dalam melawan serangan penyakit, walaupun ikan tersebut memiliki umur yang sama. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Ellis (1989) bahwa respons imun dari ikan dapat lebih dipengaruhi oleh ukuran ikan, bukan umur. Pada spesies salmonid tingkat kekebalan tinggi hanya diperoleh pada larva dengan berat minimal 1 g. Selanjutnya, perbedaan metode vaksinasi diduga juga mempengaruhi efikasi vaksin. Nuryati *et al.* (2010) menggunakan metode injeksi, sementara Khodijah (2012) menggunakan metode oral melalui pakan.

Hasil verifikasi vaksin DNA dan hasil uji ekspresi (Gambar 3) di dalam tubuh ikan membuktikan bahwa pemberian vaksin DNA melalui perendaman ikan dalam air mengandung bakteri utuh inaktif dapat terekspresi hingga hari ke-28. Ini berarti bahwa protein GP-25 secara terus-menerus diproduksi di dalam sel hingga hari ke-28 (Kanellos *et al.*, 2006). Protein imunogenik ini akan direspons oleh ikan mas untuk menghasilkan antibodi untuk meningkatkan daya tahannya terhadap infeksi KHV. Sejalan dengan hasil yang didapat oleh Boudinot *et al.* (1998) yang mengombinasikan vaksin DNA gen glikoprotein *viral hemorrhagic septicemia virus* (VHSV) dan *infectious hematopoietic necrosis virus* (IHNV) terhadap ikan *rainbow trout* yang dapat

mendeteksi ekspresi vaksin DNA hingga hari ke-45. Bahkan Garver *et al.* (2005) masih mendeteksi ekspresi vaksin DNA pIHNV-G yang diinjeksikan ke ikan *rainbow trout* pada hari ke-90.

Dalam vaksinasi konvensional dan vaksinasi protein, *booster* biasa dilakukan untuk meningkatkan kemampuan perlindungan oleh vaksin ataupun menambah periode perlindungan vaksin terhadap penyakit (Soltani & Kalbassi, 2001). Rentang waktu pemberian *booster* bergantung pada spesifikasi masing-masing vaksin. Ispir & Dorucu (2010) melakukan *booster* vaksinasi pada ikan *rainbow trout* 20 hari setelah vaksinasi pertama melalui perendaman. Begitu pula Jeney *et al.* (2009) melakukan *booster* vaksinasi gabungan *Aeromonas salmonicida* dan *A. hydrophila* untuk ikan mas pada minggu keempat, dan juga Shoemaker *et al.* (2007) yang melakukan *booster* vaksinasi pada hari ke-34 untuk ikan *Ictalurus punctatus* menggunakan vaksin monovalen *Flavobacterium columnare*, dan vaksin bivalen *F. columnare* dengan *Edwardsiella ictaluri*. Sementara itu, Altun *et al.* (2010) melakukan *booster* vaksinasi melalui oral pada ikan *rainbow trout* 60 hari setelah vaksinasi pertama melalui injeksi peritoneal. Dengan demikian, vaksinasi DNA besar kemungkinannya tidak memerlukan *booster* seperti halnya vaksinasi konvensional. Hal ini menjadi kelebihan praktis dari vaksin DNA.

Hasil histologi jaringan insang pada saat puncak masa inkubasi KHV menunjukkan bahwa perlakuan pemberian vaksin DNA memberikan kekebalan terhadap tubuh ikan yang terserang KHV. Pada ikan kontrol tanpa vaksinasi terdapat banyak kerusakan struktur jaringan organ bila dibandingkan dengan ikan dengan perlakuan vaksinasi (Gambar 4 dan 5). Seperti adanya tanda hiperplasia yang lebih banyak pada ikan kontrol bila dibandingkan dengan ikan dengan perlakuan vaksinasi, lamela yang menyatu hingga dari pangkal hingga ke ujung lamela pada ikan kontrol, sedangkan pada ikan perlakuan vaksinasi belum terlihat adanya lamela yang menyatu, dan juga adanya badan inklusi pada jaringan insang ikan kontrol. Menurut Sano *et al.* (2004) lamela sekunder menyatu

dengan adanya hiperlasia pada *branchial epithelium*, dan nekrosis sel terjadi cukup jelas. Kerusakan-kerusakan tersebut sudah mulai terjadi paling cepat dua hari setelah penginfeksi, yang terlihat jelas dengan mulai hilangnya beberapa bagian lamela (Illouze *et al.*, 2006). Kerusakan akan semakin parah terjadi ketika memasuki hari keenam hingga hari ke-11 setelah penginfeksi, di mana biasanya kerusakan pada lamela terjadi menyeluruh (El-Din, 2011).

Proses terserapnya vaksin DNA sel utuh diperkirakan masuk melalui organ pencernaan dan terserap di usus, kemudian terdistribusi melalui peredaran darah. Mekanisme kerja vaksin DNA GP-25 pada ikan mas diduga sama dengan vaksin DNA pada ikan lain yang telah diteliti sebelumnya. DNA diserap oleh sel inang masuk ke dalam nukleus dan ditranskripsikan sebagai mRNA, kemudian ditranslasikan menjadi protein imunogenik GP-25. Ekspresi protein ekstraselular yang dikenali sebagai benda asing oleh sistem imun inang, dan membangkitkan respons imun, memiliki pengaruh terhadap proses sel mediasi maupun komponen humoralnya (RUMA, 2006). Selanjutnya, protein imunogenik ini menyebabkan respons imun, yaitu produksi sel T yang akan mengeliminasi virus KHV, dan sel B yang menghasilkan antibodi. Menurut Tonheim *et al.* (2008) respons imun setelah vaksinasi vaksin DNA dimulai oleh *antigen presenting cells* (APC). APC mengandung sitosolik penyandi pDNA dapat mentranskripsi dan mentranslasikan transgen dan memproduksi protein imunogenik, menyerupai infeksi suatu patogen intraseluler dan menyebabkan timbulnya peptida antigen asing oleh *major histocompatibility complex* (MHC) kelas I pada permukaan APC. Reseptor sel T dapat mengenali peptida yang ada pada MHC kelas I dan MHC kelas II, yang menstimulasi respons sel T CD 8⁺ (sel T sitotoksik) yang memiliki fungsi secara langsung untuk menyerang benda asing yang masuk ke tubuh, dan sel T CD 4⁺ (sel T penolong) yang memiliki fungsi sebagai pengingat atau penyimpan memori. Kedua sel T tersebut, baik CD 8⁺ maupun CD 4⁺ bersama sel *natural killer* yang telah

teraktivasi kemudian memproduksi interferon tipe II (IFN- γ) (Kresno, 2001).

KESIMPULAN

Vaksinasi GP-25 dengan satu kali perendaman selama 30 menit efektif memberikan kekebalan ikan mas terhadap infeksi virus KHV. Vaksinasi DNA melalui bakteri inaktif dapat diserap oleh tubuh ikan dan mRNA terekspresi hingga hari ke-28 pasca vaksinasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Altun S, Kubilay A, Ekici S, Didinen B, Diler O. 2010. Oral vaccination lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. Kafkas Univ. Vet. Fak. DerG. 16: 211–217.
- Armend DF. 1981. Potency testing of fish vaccines. Dev. Biol. Stand. 49: 447–454.
- Boudinot P, Bernard D, Boubekeur S, Thoulouze M, Bremont M, Benmansour A. 1998. The glycoprotein of a fish rhabdovirus profiles the virus-specific T-cell repertoire in rainbow trout. J. Gen. Virol. 85: 3099–3108.
- Corbeil S, Kurath G, LaPatra SE. 2000a. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. Fish Shellfish Immunol. 10: 711–723.
- Corbeil S, LaPatra SE, Anderson ED, Kurath G. 2000b. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious haematopoietic necrosis virus. Vaccine 18: 2817–2824.
- Costa AA, Leef MJ, Bridle AR, Carson J, Novak BF. 2011. Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 315: 201–206
- El-Din MMM. 2011. Histopathological studies in experimentally infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*) with koi herpesvirus in Japan. World J. Fish Sci. 3: 252–259.
- Ellis AE. 1988. Fish Vaccination. England:

- Academic Press. pp 17.
- Ellis AE. 1989. Fish vaccination. *Aqua. Info. Series 4*: 1–5
- Garver KA, Conway CM, Elliot DG, Kurath G. 2005. Analysis of DNA-vaccinated fish reveals viral antigen in muscle, kidney and thymus, and transient histopathologic changes. *Mar. Bio.* 7: 540–553.
- Gilad O, Yun S, Adkison MA, Way K, Willits NH, Bercovier H, Hedrick RP. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.* 84: 2661–2668.
- Hartman KH, Yanong RPE, Pouder DB, Petty BD, Francis-Floyd R, Riggs AC. 2008. Koi herpesvirus (KHV) disease. Florida: Fact Sheet VM-149, The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) University of Florida (UF).
- Illouze M, Dishon A, Kotler M. 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 147–156.
- Ispir U, Dorucu M. 2010. Effect of immersion booster vaccination with *Yersinia ruckeri* extracellular products (ECP) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Int. Aquat. Res.* 2: 127–130.
- Jeney Z, Racz T, Thompson KD, Poobalane S, Ardo L, Adams A, Jeney G. 2009. Differences in the antibody response and survival of genetically different varieties of common carp (*Cyprinus carpio* L.) vaccinated with a commercial *Aeromonas salmonicida*/ *Aeromonas hydrophila* vaccine and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 677–682.
- Kanellos T, Sylvester ID, D’Mello F, Howard CR, Mackle A, Dixon PF, Chang K, Ramstad A, Midtlyng PJ, Russel PH. 2006. DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine* 24: 4927–4933.
- Khodijah S. 2012. Efektivitas frekuensi pemberian vaksin DNA melalui pakan terhadap kelangsungan hidup relatif ikan mas yang diinfeksi koi herpesvirus [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kresno SB. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*. Edisi ke-4. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Lorenzen N, LaPatra SE. 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24: 201–213.
- Mumford SL. 2004. *National Wild Fish Health Survey-Laboratory Procedures Manual*, 2nd edition. U.S: Fish and Wildlife Service, Warm Spring, GA.
- Nuryati S, Alimuddin, Sukenda, Soejoedono RD, Santika A, Pasaribu FH, Sumantadinata K. 2010. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein-25 and its expression towards increasing survival rate of KHV-infected common carp (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Natur Indonesia* 13: 47–52.
- Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* 21: 4677–4684.
- [RUMA] Responsible Use of Medicine in Agriculture Alliance. 2006. Responsible use of vaccines and vaccination in fish production. RUMA Guidelines.
- Sano M, Ito T, Kurita J, Yanai T, Watanabe N, Miwa S, Iida T. 2004. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.* 39: 165–167.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ. 2007. Immunization of eyed channel catfish *Ictalurus punctatus* eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Vaccine* 25: 1126–1131.
- Soltani M, Kalbassi MR. 2001. Protection of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* septicemia using three different antigens. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21: 235–240.
- Sunarto A, Cameron A. 2006. Epidemiology and control of koi herpesvirus in Indonesia. *Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 2006.
- Tonheim TC, Jarl B, Roy AD. 2008. What happens to the DNA vaccine in fish? A

review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 1–18.

Yuasa K, Sano M, Kurita J, Ito T, Iida L, 2005. Improvement of a PCR method with the *Sph* 1–5 primer set for the detection of

koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.* 40: 37–39.

Zonneveld N, Huisman EA, Boon JH. 1991. *Prinsip-Prinsip Budidaya Ikan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.