

Frekuensi dan persistensi vaksin DNA penyandi GP25 yang diberikan melalui pakan pada ikan mas

Frequency and persistency of DNA vaccine encoding GP25 by oral on common carp

Sri Nuryati*, Yuliyanti, Alimuddin

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680
*Surel: sri.nuryati606@gmail.com

ABSTRACT

Koi herpesvirus (KHV) is a major viral pathogen that infects common carp and koi. KHV disease outbreak is happened in almost all centre of common carp culture in Indonesia and caused mass mortality. Deoxyribonucleic acid (DNA) vaccination method is one of ways to cope with KHV infection. Vaccines were commonly given by injection. The aim of this research was to get frequency and persistency of DNA vaccine encoding GP25 given by oral delivery method in common carp. This research would like to determine dose, frequency of vaccination, persistency of DNA vaccine and culture medium for the bacterial host. DNA vaccine persistency test was done by using polymerase chain reaction (PCR) method with the specific primer for GP25 gene. The results showed that level of DNA vaccine that could be detected in feed was 7.56 ng (equal to 1.598×10^{10} copies). Efficient culture medium for *Escherichia coli* DH5 α carrying DNA vaccine was LB triptone. Feeding fish with diet supplemented with 1 mL *E. coli* DH5 α containing DNA vaccine for each fish and two times a week allowed persistence of DNA vaccine in kidney and spleen.

Keywords: common carp, KHV, DNA vaccine, GP25, persistence

ABSTRAK

Koi herpesvirus (KHV) adalah virus patogen utama yang menginfeksi ikan mas dan ikan koi. Wabah penyakit KHV terjadi di hampir semua sentra budidaya ikan mas di Indonesia dan menyebabkan kematian massal ikan. Metode vaksinasi DNA merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menanggulangi serangan KHV. Pemberian vaksin umumnya dilakukan dengan cara injeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji frekuensi dan persistensi vaksin DNA GP25 antivirus KHV yang diberikan melalui oral pada ikan mas. Pada penelitian ini dilakukan uji dosis, frekuensi pemberian vaksin, persistensi vaksin DNA, dan media kultur bakteri inang. Persistensi vaksin DNA dianalisis menggunakan metode PCR dengan primer spesifik gen GP25. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis vaksin DNA yang dapat terdeteksi dalam pakan adalah 7,56 ng (setara dengan $1,598 \times 10^{10}$ copy). Media kultur yang efisien bagi bakteri *Escherichia coli* DH5 α pembawa vaksin DNA adalah LB tripton. Pemberian pakan bervaksin berupa bakteri konsentrasi 1 mL/ekor ikan dengan frekuensi dua kali seminggu menghasilkan persistensi DNA GP25 di ginjal dan limpa.

Kata kunci: ikan mas, KHV, vaksin DNA, GP25, persistensi

PENDAHULUAN

Ikan mas *Cyprinus carpio* adalah spesies ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis penting. Spesies ini sudah tersebar luas di Indonesia dan menjadi salah satu dari sepuluh komoditas andalan perikanan budidaya di Indonesia. Namun, perkembangan budidaya ikan mas menghadapi kendala setelah serangan penyakit *koi herpes virus* (KHV) mewabah di hampir seluruh sentra budidaya ikan mas di Indonesia.

Serangan KHV pada ikan mas dan koi pertama kali ditemukan di Israel tahun 1998 (Hedrick *et al.*, 2005). Penyakit KHV dilaporkan berjangkit di wilayah antara lain di Eropa, Amerika Serikat serta Taiwan dan Jepang pada tahun 2003 (Haenen, 2004). Sejak terjangkit pertama kali di Blitar, penyakit ini telah menyebar ke hampir semua daerah di Indonesia. Virus ini mengakibatkan kematian massal mencapai 80–95% Sunarto *et al.* (2005), sehingga berdampak pada kerugian ekonomi dan sosial (Pokorova *et al.*, 2005).

Menurut Hedrick *et al.* (2005), penyakit KHV menyebabkan kematian yang besar dan bersifat sporadis pada ikan mas dan koi. Serangan penyakit ini menunjukkan kematian yang sangat cepat, ikan akan terlihat sakit dan akhirnya mati dalam 24–48 jam. Alternatif yang dilakukan oleh masyarakat dalam menanggulangi wabah ini adalah dengan bahan kimia, fitofarmaka, dan penerapan biosekuriti. Namun hasil yang diperoleh tidak maksimal untuk mencegah wabah KHV. Mengingat sifat virus herpes yang berasosiasi kuat dengan sel dan sulit untuk ditanggulangi, maka langkah pencegahan perlu dilakukan. Metode pendeteksian KHV diantaranya adalah isolasi virus dari kultur sel, pengamatan dengan mikroskop elektron, uji PCR, ELISA, dan hibridisasi *in situ* (Soliman & El-Matbouli, 2005). Salah satu langkah pencegahan yang bisa dilakukan adalah dengan vaksinasi. Vaksin yang dapat diberikan berupa vaksin konvensional dan vaksin rekombinan.

Serangan KHV pada ikan mas di Indonesia dapat diatasi dengan pemberian vaksin DNA. Kelebihan dari vaksin DNA (Lorenzen & LaPatra, 2005) adalah bersifat generik dan sederhana, aman dan tidak menimbulkan risiko terinfeksi penyakit, dapat mencapai tujuan vaksinasi ketika vaksinasi konvensional gagal, mampu mengaktifkan sistem kekebalan humoral dan seluler, memberikan proteksi yang baik apabila diberikan pada stadia awal, proteksi tidak dipengaruhi oleh suhu, dan penyediaan vaksin baru dapat dilakukan dalam waktu cepat dengan biaya yang relatif murah. Vaksin DNA dapat melindungi organisme melawan penyakit dengan cara menginjeksikan DNA murni (*naked DNA*) untuk meningkatkan respons kekebalan. Vaksin konvensional atau vaksin yang dilemahkan memiliki keterbatasan yang dapat disempurnakan oleh vaksin DNA.

Nuryati *et al.* (2010) mengatakan bahwa konstruksi vaksin DNA yang mengandung sisipan gen glikoprotein 25 (GP25) berhasil dikembangkan menggunakan gen virus isolat asal Indonesia sebagai sumber DNA yang disisipkan ke plasmid untuk KHV. Perbedaan strain virus mengandung konsekuensi adanya perbedaan sekuens gen penyandi protein imunogenik seperti yang ditunjukkan pada glikoprotein ORF 25 (bagian virus yang bersifat imunogenik) dari KHV asal Indonesia memiliki perbedaan susunan asam amino dengan KHV asal Jepang, Amerika Serikat dan Israel. Dengan demikian vaksin DNA yang dibuat menggunakan isolat Indonesia diduga lebih efektif dibandingkan dengan isolat dari luar.

Metode vaksinasi dengan pemberian vaksin DNA melalui pakan buatan pada stadia benih ikan mas diharapkan menjadi salah satu alternatif pengobatan secara massal yang dapat menangani permasalahan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh virus. Menurut Lorenzen dan LaPatra (2005) salah satu kekurangan vaksin DNA yaitu masih diperlukannya suatu strategi baru untuk vaksinasi secara massal. Hal ini juga diungkapkan oleh Lorenzen dan LaPatra (2005) sebagai salah satu kelebihan dari vaksin DNA yaitu proteksi vaksin DNA akan lebih baik apabila diberikan pada stadia awal. Pemberian vaksin melalui oral yaitu melalui pakan perlu dikembangkan lebih lanjut dengan menguji dosis, frekuensi dan persistensi vaksin tersebut di tubuh ikan sehingga tujuan dari dilakukannya vaksinasi dapat tercapai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji frekuensi dan persistensi DNA GP25 pada organ target ikan mas *Cyprinus carpio*.

BAHAN DAN METODE

Perhitungan jumlah kepadatan bakteri

Bakteri *E. coli* terkonstruksi (pMBa-GP25) dikultur pada empat jenis media cair, yaitu 2×YT, LB polipepton, LB tripton, dan TSB dengan penambahan ampisilin 1:1.000. Inkubasi bakteri dilakukan menggunakan alat pengocok dengan kecepatan 240 rpm pada suhu 37 °C selama 16 jam. Sebanyak 2 mL media cair yang telah ditumbuhi oleh bakteri dimasukkan ke dalam kuvet untuk menghitung kepadatan bakteri menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

Pembuatan pelet bakteri terkonstruksi

Pembuatan pelet bakteri bertujuan untuk memisahkan sel bakteri dengan media kultur. Sebanyak 20 mL bakteri hasil kultur dituangkan secara parsial ke dalam masing-masing tabung mikro bervolume 1,5 mL, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm dan suhu 4 °C selama 30 detik. Hasil pembuatan pelet bakteri dicuci dengan 1 mL PBS sebanyak tiga kali. Setelah dicuci dengan PBS, bakteri dimatikan dengan perlakuan panas pada suhu 80 °C selama lima menit selanjutnya disentrifugasi dan diresuspensi kembali dengan PBS sebanyak 1 mL.

Pembuatan dan pemberian pakan bervaksin

Bakteri mengandung vaksin DNA dicampurkan terlebih dahulu dengan kuning telur sebanyak 2% volume bakteri sebelum

dicampurkan ke pakan. Kuning telur berfungsi sebagai bahan pengikat. Pakan yang mengandung vaksin DNA kemudian didiamkan pada suhu ruang sampai kering. Pencampuran pakan buatan dengan vaksin DNA dilakukan sesaat sebelum pemberian pakan perlakuan. Ikan diberi pakan bervaksin yang mengandung sebanyak 10^6 cfu/mL bakteri mengandung vaksin DNA GP25 per ekor ikan dengan frekuensi pemberian satu minggu sekali dan satu minggu dua kali yang diberikan secara *at satiation*.

Pemeriksaan dan perhitungan jumlah perbanyak plasmid pada pakan

Pemeriksaan dan perhitungan jumlah *copy* plasmid bakteri pada pakan bertujuan untuk mengetahui distribusi dan kemampuan pakan buatan sebagai pembawa vaksin DNA. Pemeriksaan pakan perlakuan yang mengandung bakteri terkonstruksi dilakukan dengan melarutkan tiga butir pakan perlakuan yang berasal dari tiga titik sampel yang berbeda ke dalam masing-masing tabung mikro 1,5 mL berisi 300 μ L alkohol 70% selama satu jam. Pakan diambil dari dalam tabung mikro lalu larutan disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 12000 rpm selama sepuluh menit. Supernatan dibuang dan pelet dikering-udarkan. Setelah benar-benar kering, pelet bakteri langsung digunakan dalam analisis *polymerase chain reaction* (PCR).

Proses PCR dilakukan menggunakan primer spesifik glikoprotein KHV yaitu FGP 5' -TTGTCGACATGACGGGTTGTGGGG TTTG- '3 dan RGP 5' -TCAGCAAGGCGGCCTT CACGG- '3. Reaksi PCR yang digunakan, yaitu dengan volume 10 μ L yang mengandung 1 μ L LA *buffer*; 1 μ L dNTPs *mix*; 1 μ L MgCl₂; 1 μ L (1 pmol) masing-masing primer; 0,05 μ L LA *Taq polymerase* (Takara Bio, Shiga, Japan), 1 μ L DNA dan sisanya akuabides. Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: *predenaturasi* pada suhu 95 °C selama tujuh menit; 45 siklus pada suhu 95 °C selama 30 detik, 64 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 30 detik; serta pada suhu 72 °C selama tujuh menit. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%.

Perbedaan ketebalan pita-pita DNA hasil elektroforesis diukur menggunakan *software* UN-SCAN-IT gel. 6.0. Pita DNA yang memiliki ketebalan berbeda mencirikan perbedaan kandungan bakteri bervaksin dalam pakan. Untuk mengetahui jumlah *copy* plasmid pada pakan perlakuan, hasil digitasi standar pMBa-GP25

digunakan sebagai acuan untuk menentukan kisaran konsentrasi DNA pada pakan perlakuan. Kemudian konsentrasi DNA dikonversi menggunakan rumus persamaan berikut ini.

$$CP = \frac{A}{(1,1 \times 10^{-15})^* \times (430 \text{ bp})^{**}}$$

Keterangan:

CP: jumlah *copy* plasmid yang terkandung pada pakan (*copy*/ μ g)

A : hasil pengukuran ketebalan pita (*software* UN-SCAN-IT gel. 6.0)

* : konversi *base pairs* (1 bp = $1,1 \times 10^{-15}$ μ g)

** : ukuran pita DNA untuk situs pengenalan GP25 (430 bp)

Analisis persistensi vaksin DNA

Deteksi vaksin DNA pada masing-masing organ ikan mas ini dilakukan dengan tahapan ekstraksi DNA organ, amplifikasi dengan PCR, dan elektroforesis (Meyer *et al.*, 2012). DNA diekstraksi dari jaringan ginjal dan limpa ikan mas pada hari pertama, hari ketiga, dan hari ketujuh setelah pemberian pakan perlakuan. Sebanyak 20–25 mg sampel jaringan hasil perlakuan dimasukkan ke dalam setiap tabung mikro bervolume 1,5 mL. Langkah pertama adalah melisis jaringan melalui penambahan 200 μ L *cell lysis solution* (Gentra, Minneapolis, USA) dan 1,5 μ L proteinase K (20 mg/mL) menggunakan pipet mikro ke dalam sampel jaringan kemudian dihomogenasi menggunakan vorteks dan diinkubasi menggunakan *dry thermo* unit pada suhu 55 °C dan dibiarkan semalaman (12–16 jam). Setelah melewati proses inkubasi, langkah selanjutnya adalah digesti RNA untuk penghilangan RNA. Sampel diangkat dari inkubator dan dibiarkan pada suhu ruang selama sepuluh menit. Sebanyak 1,5 μ L RNase (4 mg/mL) ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk dengan membolak-balik tabung mikro secara perlahan sebanyak 25 kali, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah itu, didiamkan dalam suhu ruang selama sepuluh menit.

Sebanyak 100 μ L *protein precipitation solution* ditambahkan ke dalam tabung mikro kemudian divorteks dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik kemudian sampel disimpan dalam es selama sepuluh sampai 15 menit. Setelah itu sampel disentrifugasi selama sepuluh menit pada suhu 4 °C, 12.000 rpm. Langkah keempat adalah pengendapan DNA. Supernatan hasil sentrifugasi

dimasukkan ke dalam tabung mikro bervolume 1,5 mL yang sebelumnya telah diisi dengan 300 μ L isopropanol. Selanjutnya, larutan diaduk dan diencerkan sebanyak 50 kali, serta disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 12.000 rpm selama sepuluh menit. Supernatan dari sampel dibuang dan ditambahkan etanol 70% (dingin) pada pelet genom serta disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama sepuluh menit pada suhu 4 °C. Langkah terakhir, etanol dibuang dan dikering-udarkan. Setelah kering, pelet DNA dilarutkan pada *ion exchange water* sebanyak 30 μ L dan disimpan dalam lemari pembeku (-20 °C) untuk digunakan pada proses selanjutnya (PCR dan elektroforesis).

Amplifikasi DNA hasil isolasi dilakukan menggunakan mesin PCR. Tahap PCR diawali dengan pembuatan *premix*, yaitu campuran bahan prereaksi yang akan digunakan dalam proses PCR. Primer yang digunakan adalah primer spesifik glikoprotein KHV. Reaksi PCR yang digunakan, yaitu dengan volume 10 μ L yang mengandung 1 μ L LA *Buffer*; 1 μ L dNTPs *mix*; 1 μ L MgCl₂; 1 μ L (1 pmol) masing-masing primer; 0,05 μ L LA *Taq polymerase* (Takara Bio, Shiga, Japan); 1 μ L DNA genom dan sisanya akuabides. Amplifikasi PCR dengan situs pengenalan KHV : *pre-denaturasi* pada suhu 95 °C selama tujuh menit; 45 siklus pada suhu 95 °C selama 30 detik, 64 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 30 detik; serta satu siklus pada suhu 72 °C selama tujuh menit. Selain itu amplifikasi β -aktin ikan mas dilakukan sebagai kontrol *internal loading* DNA. Primer yang digunakan adalah F ccAt: 5'-ATGGTTATGGGACAGAAGGAC-3' dan R c cAT: 5'-CTGTGTCATCTTTTCCCTGTTG GC-3'. Program yang digunakan: *pre-denaturasi* pada suhu 94 °C selama tiga menit; 35 siklus pada suhu 95 °C selama 20 detik, 59 °C selama 20 detik dan 72 °C selama 30 detik; serta pada suhu 72 °C selama tiga menit.

Separasi hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Sample DNA hasil PCR sebanyak 3 μ L dicampurkan dengan 0,5 μ L *loading buffer*, lalu dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel dengan menggunakan pipet mikro. Setelah itu 3 μ L marker DNA dimasukkan ke dalam sumur di dekat sumur sampel. Bak elektroforesis ditutup dan listrik dialirkan dengan tegangan 200 Volt dan kuat arus 70 mA. Fragmen DNA akan bermigrasi dari kutub negatif ke positif. Setelah *bromophenol blue* bermigrasi sampai 3/4 bagian dari panjang gel, aliran listrik dihentikan. Lalu

gel diangkat dan dilepaskan dari cetaknya. Gel tersebut diletakkan di atas *ultraviolet illuminator* untuk visualisasi DNA. Pengambilan gambar menggunakan kamera digital Canon® PowerShot A640 yang terpasang pada kotak *ultraviolet illuminator*. Kamera tersebut terhubung ke komputer dan pemotretan dilakukan secara otomatis menggunakan bantuan perangkat lunak *image capture*.

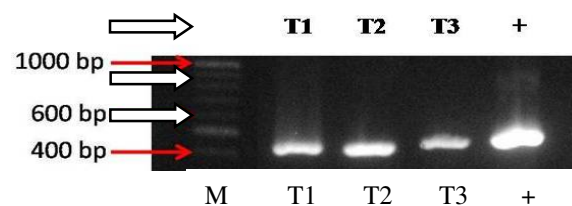
Analisis data

Parameter yang diamati adalah jumlah DNA yang terikat pada pakan buatan, jenis media yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri serta distribusi gen mBa-GP25 pada organ target dari visualisasi hasil PCR. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan menggunakan tabel, grafik, dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan bakteri yang mengandung pmBA-GP25 yang dikultur pada empat jenis media cair menunjukkan hasil yang berbeda. Kepadatan bakteri tertinggi diperoleh dengan menggunakan media LB *tripton* (LB-T) dengan biaya pembuatan bahan sebesar Rp 30,30/mL (Tabel 1). setelah pemberian pakan perlakuan. Selanjutnya gen GP25 tidak terdeteksi sampai hari ketujuh setelah pemberian pakan perlakuan.

Jumlah bakteri yang terkandung pada pakan buatan ditunjukkan oleh ketebalan pita DNA dan jumlah *copy* plasmid pada pakan perlakuan.



Gambar 1. Deteksi gen GP25 pada pakan perlakuan titik pengambilan pertama (T1), titik pengambilan kedua (T2), dan titik pengambilan ketiga (T3).

Tabel 1. Jumlah kepadatan bakteri pada media cair TSB, 2 \times YT, LB-P dan LB-T

No.	Media	Kepadatan (10 ⁶ /mL)	Biaya bahan/mL
1.	TSB	14,09 \pm 0,49	Rp 48,00
2.	2 \times YT	9,63 \pm 0,11	Rp 45,87
3.	LB-P	11,96 \pm 1,10	Rp 32,86
4.	LB-T	18,30 \pm 2,64	Rp 30,30

Keterangan: LB-P: LB polipepton; LB-T: LB tripton.

Tabel 2. Hasil digitasi pakan bervaksin GP25 dari pengambilan tiga titik sampel

Sampel	Konsentrasi DNA GP25 pada pakan (ng/ μ L)	Ketebalan pita DNA hasil amplifikasi (ng)
1	38,76	4,417
2	48,21	5,967
3	31,51	3,228
Jumlah		13,612
Rata-rata		4,537

Deteksi gen GP25 pada pakan perlakuan membuktikan keberhasilan distribusi vaksin DNA ke dalam pakan buatan pada pengujian tiga titik sampel (Gambar 1) dan kuantifikasi hasil digitasi pakan bervaksin MBa-GP25 (Tabel 2).

Media kultur memengaruhi kemampuan mikroorganisme untuk tumbuh dan tetap hidup. Selanjutnya, hasil kultur menggunakan empat jenis media berbeda menghasilkan konsentrasi bakteri yang berbeda. Berdasarkan hasil perhitungan jumlah kepadatan bakteri dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm, media LB *tripton* merupakan media yang menghasilkan bakteri paling banyak, yaitu $(18,3 \pm 2,64) \times 10^6$ cfu/mL dan ekonomis, diikuti oleh media TSB, LB *polipepton*, dan 2 \times YT (Tabel 1). Dengan demikian disarankan menggunakan media LB *tripton* untuk memproduksi bakteri *E. coli* mengandung vaksin DNA.

Vaksin DNA mengandung satu atau lebih gen yang memberi kode sebagian sifat antigenik suatu *virus core protein* atau *envelope protein* (Lorenzen & LaPatra, 2005). Ekspresi antigen yang terjadi di dalam sel inang yang telah divaksinasi merangsang pengaktifan sistem kekebalan tubuh inang. Pada penelitian ini digunakan vaksin DNA yang mengandung gen imunogenik GP25 yang sudah diuji aktivitasnya (Nuryati *et al.*, 2010).

Tahapan isolasi plasmid mengambil porsi biaya yang paling mahal dibandingkan tahap kultur bakteri (Nuryati *et al.*, 2010), sehingga diperlukan alternatif metode transfer vaksin dengan memangkas tahapan isolasi plasmid yang memungkinkan pemberian vaksin dalam bentuk bakteri terkonstruksi. Pada penelitian ini dikembangkan metode pemberian vaksin melalui pakan buatan. Melalui metode PCR, persistensi vaksin DNA GP25 dapat terdeteksi pada organ target yaitu ginjal dan limpa. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian vaksin DNA GP25 melalui pakan buatan berpeluang sebagai metode transfer untuk mencegah virus KHV pada ikan mas.

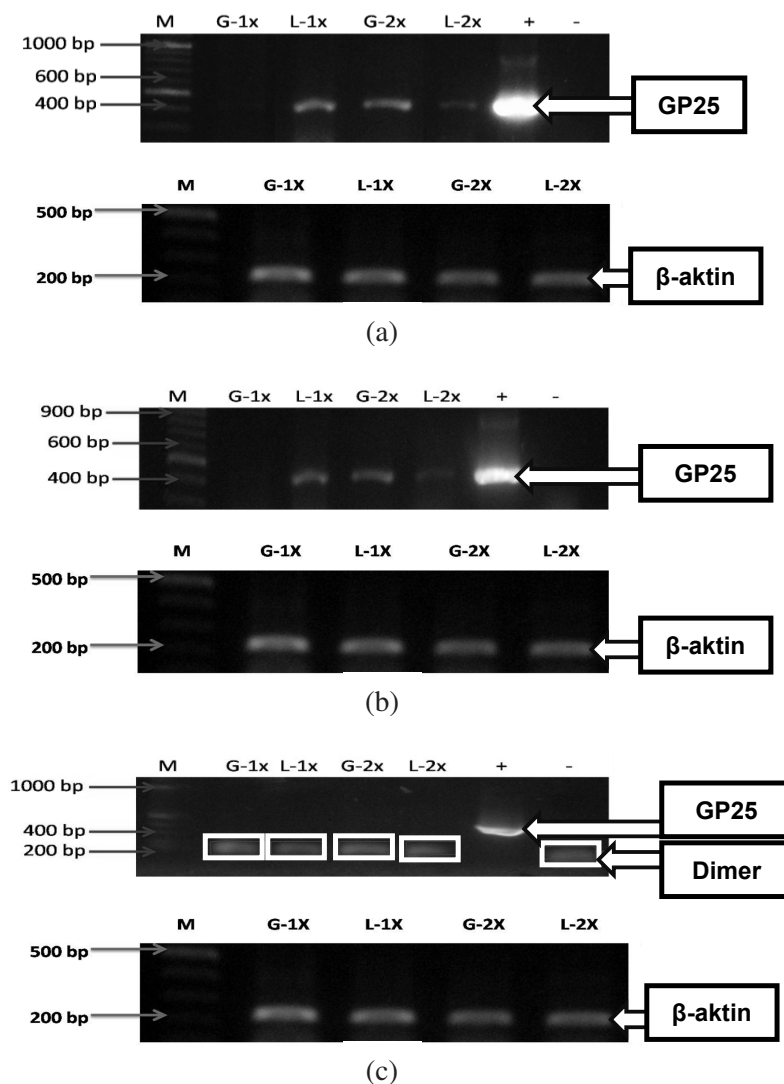
Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan terkait dengan penentuan dosis bakteri *E. coli* DH5 α sebagai vektor pembawa gen MBa-GP25 diperoleh dosis optimum sebesar 10^6 cfu/mL. Hal ini diperkuat oleh produk visualisasi PCR yang menunjukkan deteksi gen MBa-GP25 berukuran 430 bp pada organ target yaitu ginjal dengan frekuensi pemberian pakan sebanyak dua kali dalam satu minggu. Munculnya pita DNA pada organ target diduga dapat menginduksi sistem imun. Untuk meyakinkan hal ini, perlu dilakukan ujiantang dengan virus KHV, sehingga dapat membuktikan kinerja vaksin DNA.

Perhitungan jumlah *copy* plasmid bakteri pada pakan bertujuan untuk mengetahui kemampuan pakan buatan sebagai pembawa vaksin DNA melalui pencampuran secara manual. Berdasarkan hasil visualisasi produk PCR, maka distribusi plasmid GP25 pada pakan tidak merata. Jumlah perbanyak DNA asing yang terdapat dalam pakan buatan mencapai nilai tertinggi yaitu pada titik sampel kedua dalam tiga butir pakan buatan. Dosis vaksin DNA dalam pakan buatan adalah 7,56 ng (dengan jumlah perbanyak DNA yaitu $1,598 \times 10^{10}$). Variasi kandungan bakteri dalam pakan diduga menjadi salah satu penyebab variasi keberadaan DNA vaksin di organ ginjal dan limpa. Variasi jumlah pakan yang dimakan juga diduga menyebabkan perbedaan ketebalan pita DNA produk PCR antar individu ikan mas.

Dosis vaksin DNA secara oral melalui pakan buatan sebesar 7,56 ng (dengan jumlah *copy* DNA yaitu $1,598 \times 10^{10}$) relatif lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Nuryati *et al.* (2010). Dosis vaksin DNA terbaik melalui injeksi yang digunakan pada ujiantang terhadap sintasan ikan mas yang diinfeksi koi herpes virus (KHV) adalah 7,5 μ g (dengan jumlah *copy* DNA yaitu $7,8 \times 10^{12}$) dan 12,5 μ g (dengan jumlah *copy* DNA yaitu 13×10^{12}) (Nuryati *et al.*, 2010). Dosis yang ditemukan juga lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Zheng *et al.* (2006), yaitu 15 μ g. Penggunaan bakteri sebagai vektor pembawa gen GP25 yang dicampurkan ke dalam pakan buatan dapat menurunkan dosis vaksin DNA dengan metode injeksi dari 10^{12} menjadi 10^6 . Namun dengan penurunan dosis tersebut, ekspresi gen GP25 belum bisa dideteksi dengan RT-PCR. Dengan demikian penelitian menggunakan dosis lebih tinggi masih perlu dilakukan. Terkait dengan tingginya biaya pembuatan vaksin DNA menggunakan metode injeksi, maka diharapkan pemberian vaksin DNA secara oral dapat menekan biaya vaksinasi.

Ginjal adalah organ yang memiliki kemampuan sebagai penyaring zat-zat sisa metabolisme tubuh, memproduksi hormon eritropoietin yang membantu pembuatan sel darah merah dan menyaring darah. Limpa berfungsi mengakumulasi limfosit dan makrofaga, degradasi eritrosit, tempat cadangan darah, dan sebagai organ pertahanan terhadap infeksi partikel asing yang masuk ke dalam darah. Oleh karena itu, ginjal dan limpa merupakan organ target yang diisolasi untuk mendeteksi gen MBa-GP25 setelah H+1, H+3, dan H+7 pemberian pakan perlakuan. Virus DNA lebih banyak ditemukan pada ginjal, jaringan usus dari ikan yang terinfeksi, tetapi juga terdeteksi dalam jaringan hati dan ginjal pada jumlah yang lebih rendah (Stingley *et al.*, 2003). Insang, ginjal, dan limpa adalah organ yang paling banyak terinfeksi KHV (Gilad *et al.*, 2004).

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa DNA GP25 dapat terdeteksi setelah hari pertama (Gambar 2a) dan hari ketiga (Gambar 2b) setelah pemberian pakan perlakuan. Pada ginjal setelah H+1 dan H+3 dengan frekuensi satu minggu sekali pemberian, dihasilkan pita DNA yang lebih tipis dibandingkan frekuensi pemberian satu minggu dua kali pemberian. Selanjutnya, pada hari ketujuh setelah pemberian pakan perlakuan (Gambar 2c), gen GP25 tidak terdeteksi pada semua organ target. Hal ini mungkin disebabkan karena semua atau hampir semua plasmid DNA telah terpotong-potong oleh enzim restriksi endogenus. Dengan demikian, pemberian pakan bervaksin dua kali seminggu diduga dapat menginduksi sistem imun ikan mas. Hal ini diperkuat oleh pendapat Gillund *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa vaksin DNA yang diberikan ke ikan akan mengalami beberapa kemungkinan antara lain: DNA akan



Gambar 2. Deteksi gen GP25 dan kontrol internal β -aktin pada ginjal (G) dan limpa (L) pada (a) hari pertama, dan (b) hari ketiga setelah pemberian pakan perlakuan. Gen GP25 tidak terdeteksi pada semua jaringan setelah perlakuan (c) hari ketujuh.

masuk (*uptake*) ke dalam sel yang ada di lokasi injeksi; DNA akan tertinggal di bagian luar sel (ekstraseluler); DNA akan didegradasi oleh enzim endonuklease di jaringan tempat injeksi; dan DNA terdistribusi melalui darah ke jaringan lain. Target yang diharapkan dari pemberian vaksin DNA ini adalah munculnya respons imun pada ikan yang diberi vaksin. Nuryati *et al.* (2010) menyatakan bahwa vaksin DNA yang terdistribusi ke jaringan lain dan terekspresi maka vaksin DNA tersebut akan mentranslasikan glikoprotein (GP) virus KHV, yang harus dipastikan tidak menginfeksi inangnya sendiri. Vaksin DNA yang diberikan melalui oral kemungkinan besar akan diserap melalui usus dan diedarkan ke jaringan tubuh. Pada penelitian ini vaksin DNA terekspresi pada bagian ginjal dan limpa yang merupakan organ yang terlibat dalam respons imun.

Bila gen GP glikoprotein ditranslasi dan selanjutnya protein GP dikenali oleh sistem imun sehingga terbentuk antibodi dan menginduksi memori, maka vaksinasi DNA melalui pakan buatan dapat menjadi alternatif pengendalian infeksi KHV pada ikan mas dan ikan koi. Pemberian vaksin DNA GP25 melalui pakan buatan dapat terdeteksi pada ikan mas stadia benih. Namun demikian ikan yang divaksin harus memenuhi kriteria yaitu bahwa organ yang bertanggung jawab dalam sistem kekebalan sudah terbentuk dan berfungsi sempurna sehingga dapat merespons adanya vaksin yang masuk ke dalam tubuh, termasuk vaksin DNA.

KESIMPULAN

Pemberian pakan bervaksin dengan frekuensi dua kali seminggu menghasilkan persistensi DNA terbaik di ginjal dan limpa sampai hari ketiga setelah pemberian pakan. Dosis vaksin DNA yang dapat terdeteksi pada pakan adalah 7,56 ng yang setara dengan $1,598 \times 10^{10}$ copy. Media kultur yang efisien untuk produksi vaksin GP25 adalah LB tripton.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pembuatan konstruksi vaksin pmBA-GP25 dilakukan di laboratorium Prof. Dr. Goro Yoshizaki, *Tokyo University of Marine Science and Technology*.

DAFTAR PUSTAKA

Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Bercovier H, Hedrick RP. 2004.

- Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissue of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 179–187.
- Gillund F, Dalmo R, Tonheim TC, Seternes T, Myhr AI. 2008. DNA vaccination in aquaculture expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture* 284: 25–34.
- Haenen OL, Way MK, Bergmann SM, Ariel E. 2004. The emergence of koi herpes virus and its significance to European aquaculture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24: 293–307.
- Hedrick RP, Gilad O, Yun SC, McDowell TS, Waltzek TB, Kelley GE, Adkison MA. 2005. Initial isolation and characterization of a herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bulletin Fisheries Research Agency* 2: 1–7.
- Lorenzen N, LaPatra SE. 2005. DNA vaccines for aquaculture fish. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootic)* 24: 201–213.
- Meyer K, Bergmann SM, Marel MVD, Steinhagen D. 2012. Detection of koi herpesvirus: impact of extraction method, primer set, and DNA polymerase on the sensitivity of polymerase chain reaction examinations. *Aquaculture Research* 43: 835–842.
- Nuryati S, Alimuddin, Sukenda, Soejoedono RS, Santika A, Pasaribu FH, Sumantadinata K. 2010. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein gene and its expression towards increasing survival of KHV-infected common carp *Cyprinus carpio*. *Natur Indonesia* 13: 47–52.
- Pokorova D, Vesely T, Piackova V, Reschova S, Hulova J. 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Veterinary Medicine* 50: 139–147.
- Soliman H, El-Matbouli M. 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of koi herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* 2: 83–91.
- Stingley RL, Griffin BR, Gray WL. 2003. Channel catfish virus gene expression in experimentally infected channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 26: 487–493.
- Sunarto A, Rukyani A, Itami T. Indonesian experience on the outbreak of koi herpesvirus in Koi and Carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin*

Fisheries Research Agency 2: 15–21.
Zheng FR, Sun XQ, Liu HZ, Zhang JX. 2006.
Study on the distribution and expression of

DNA vaccine against lymphocytis disease
virus in Japanese flounder *Paralichthys
olivaceus*. Aquaculture 261: 1.128–1.134.