

## ***Artemia* sp. sebagai vektor pembawa vaksin DNA untuk benih ikan mas *Cyprinus carpio***

### ***Artemia* sp. as a DNA vaccine vector for common carp *Cyprinus carpio* larvae**

**Sri Nuryati\*, Sekar Sulistyning Hadiwibowo, 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 herpes virus (KHV) is one of the most common impetuses for disease on common carp *Cyprinus carpio*. Generally, viral disease is difficult to cure because virus is intra-cellular parasite, that virus survives, multiplies, and lives only if it on the host cell. Oral vaccine delivery through *Artemia* sp. is of one alternative way to overcome this problem. This experiment was carried out by analysis DNA vaccine expression encoding of glycoprotein gene (GP-11) on *C. carpio*. Bacteria containing plasmid Krt-GP-11 as vaccine is served through *Artemia* sp. as a vector. *Artemia* sp. was given for one and two times a week to three weeks old common carp. Organs of fish fed by *Artemia* sp. were analyzed every three days after vaccination. The expression of GP-11 in kidney in each treatment is also observed by the use of RT-PCR method, within ten days after vaccination. The experiment showed that dose of DNA vaccine in whole bacteria could be expressed is  $10^6$  cfu/mL in a once or twice provisions a week. DNA vaccine could be detected in three organs. RT-PCR analysis also showed that the expression of GP-11 can be detected in all tested organs. In conclusion, *Artemia* sp. can be used as a vector to carry plasmid GP-11 vaccine for common carp *Cyprinus carpio* larvae.

Keywords: DNA vaccine, KHV, *Artemia* sp., common carp

#### **ABSTRAK**

Salah satu penyakit pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang disebabkan oleh virus adalah *koi herpes virus* (KHV). Penyakit yang disebabkan oleh virus umumnya sulit untuk disembuhkan karena virus merupakan parasit intraseluler, yaitu virus hanya dapat hidup, bertahan hidup, dan memperbanyak diri di dalam sel inang. Metode pemberian vaksin DNA secara oral melalui *Artemia* sp. merupakan salah satu alternatif pengobatan yang diharapkan dapat menangani permasalahan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh virus. Pada penelitian ini dilakukan uji ekspresi vaksin DNA yang menyandikan glikoprotein 11 (GP-11) pada ikan mas. Bakteri yang mengandung plasmid Krt-GP-11 sebagai vaksin diberikan melalui *Artemia* sp. sebagai pembawa vaksin. Pemberian *Artemia* sp. dilakukan satu dan dua kali seminggu pada ikan mas umur tiga minggu. Keberadaan DNA vaksin di usus, ginjal, dan insang dianalisis menggunakan metode PCR. Organ diambil setiap tiga hari setelah pemberian vaksin. Ekspresi gen GP-11 juga diamati pada organ ginjal di setiap perlakuan dengan menggunakan metode RT-PCR, pada sepuluh hari setelah pemberian vaksin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA vaksin yang diberikan dengan dosis  $10^6$  cfu/mL pada perlakuan satu dan dua kali seminggu dapat terdeteksi pada ketiga organ. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa ekspresi GP-11 dapat terdeteksi pada semua organ uji di setiap perlakuan. Dengan demikian *Artemia* sp. dapat digunakan sebagai vektor pembawa vaksin plasmid GP-11 dengan frekuensi pemberian vaksin untuk larva ikan mas.

Kata kunci: vaksin DNA, KHV, *Artemia* sp., ikan mas

#### **PENDAHULUAN**

Banyak faktor penyebab ikan sakit, salah satu diantaranya adalah virus. Virus dapat menyebabkan kematian massal karena bersifat patogen. Pada ikan mas *Cyprinus carpio* salah

satu penyakit yang disebabkan oleh virus adalah *koi herpes virus* (KHV) (Hedrick *et al.*, 2000). Serangan oleh virus KHV ini terjadi di Indonesia sejak Maret 2002 mulai dari Blitar di Jawa Timur, kemudian menyebar cepat di sepanjang pulau Jawa, Bali, Sumatra bagian Selatan, Kalimantan

Timur, dan Sulawesi Tengah. Kerugian yang diakibatkan serangan virus ini mencapai 150 milyar sampai dengan Desember 2003 (Sunarto *et al.*, 2005). Pada bulan September 2004, virus KHV menyerang Lubuk Linggau, Sumatra Selatan yang menyebabkan kematian pada ikan mas sebesar 150 ton. Pada akhir Oktober 2004, penyakit ini mengakibatkan kematian 3.400 ton ( $\pm$ Rp 34 milyar) ikan mas dalam 2.216 karamba jaring apung di Sumatra Utara (Sunarto & Kusri, 2006).

Penyakit yang disebabkan oleh virus umumnya sulit untuk disembuhkan karena virus merupakan parasit intraseluler, yaitu virus hanya dapat hidup, bertahan hidup, memperbanyak diri, dan berdiam diri jika berada di dalam sel inang. Metode pemberian vaksin DNA merupakan salah satu alternatif pengobatan yang diharapkan dapat menangani permasalahan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh virus. Kelebihan dari vaksin DNA adalah bersifat generik, sederhana, aman, dan tidak menimbulkan risiko terinfeksi penyakit, serta dapat mencapai tujuan vaksinasi ketika vaksinasi konvensional gagal. Vaksin DNA dapat mengaktifkan sistem kekebalan humoral dan seluler, memberikan proteksi yang baik apabila diberikan pada stadia awal, proteksinya tidak berpengaruh terhadap suhu, menyediakan vaksin baru dalam waktu cepat dengan biaya yang murah (Lorenzen & LaPatra, 2005). Plasmid vaksin DNA merupakan molekul berbentuk sirkular yang terdiri atas *double-stranded deoxyribonucleic acids* (tidak berbeda dengan DNA di kromosom), mampu mereplikasi diri sendiri di dalam sel prokariot (Gillund *et al.*, 2008).

Konstruksi vaksin DNA untuk KHV di Indonesia pertama kali diuji oleh Nuryati *et al.* (2010) yaitu vaksin Act-GP-25. Vaksin Act-GP-25 telah berhasil terekspresi pada ginjal, limpa, otot, dan insang. Vaksin Act-GP-25 yang diberikan pada ikan mas ukuran 10–15 g melalui penyuntikan dapat terekspresi pada dosis 7,5  $\mu$ g dan 12,5  $\mu$ g (Nuryati *et al.*, 2010). Namun pemberian dengan cara injeksi memerlukan biaya yang mahal dan tidak praktis diterapkan ke petani. Atas dasar itu, pemberian vaksin Krt-GP-11 diberikan ke ikan mas melalui pakan alami yaitu *Artemia* sp. Hal ini sesuai dengan Leong (1986) yaitu meskipun aplikasi melalui injeksi *intramuskular* (IM) merupakan metode yang dapat dipertimbangkan dalam vaksinasi, akan tetapi pengembangan aplikasi dengan metode lain perlu terus dilakukan misalnya melalui perendaman atau melalui pencampuran pakan

(*edible vaccine*) dengan mempertimbangkan keamanan bagi lingkungan.

Pemberian vaksin Krt-GP-11 dilakukan pada ikan mas umur tiga minggu karena menurut Lorenzen dan LaPatra (2005) salah satu kelebihan dari vaksin DNA adalah proteksi vaksin DNA akan lebih baik apabila diberikan pada stadia awal. Vaksinasi pada ikan kecil lebih efektif dibandingkan pada ikan besar karena jaringan pada ikan kecil lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan jaringan pada ikan besar. Pemberian vaksin DNA pada larva ikan mas sebaiknya dilakukan secara massal sehingga efektif diterapkan pada budidaya ikan mas yang dilakukan secara intensif. Penentuan dosis yang tepat diperlukan agar vaksin dapat terekspresi dan membentuk sistem imun di dalam tubuh larva ikan mas. Menurut Lorenzen dan LaPatra (2005) salah satu kekurangan vaksin DNA yaitu masih diperlukannya suatu strategi baru untuk vaksinasi secara massal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan *Artemia* sp. dalam mentransfer vaksin DNA ke benih ikan mas *Cyprinus carpio* usia tiga minggu.

## BAHAN DAN METODE

### Kultur bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Penelitian ini diawali dengan pengkulturan bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  terkonstruksi vaksin DNA GP-11. Koloni tunggal bakteri tersebut diambil dari media padat dan dibiakkan pada 20 mL media cair 2 $\times$ YT+Kanamicin (20 mg/mL) selama 16–18 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 240 rpm (1 mL 2 $\times$ YT untuk satu ekor ikan mas). Jumlah bakteri dalam media 2 $\times$ YT sebesar 10<sup>6</sup> cfu/mL. Bakteri hasil kultur diendapkan menggunakan sistem sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik dan selanjutnya dicuci sebanyak tiga kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan volume 1 mL. Suspensi bakteri yang terbentuk dilarutkan dengan PBS sebanyak 1 mL dan diinkubasi pada suhu 80 °C selama lima menit (4 mL bakteri pada media cair adalah 1 mL suspensi bakteri+PBS).

### Pengayaan *Artemia* sp. dengan vaksin DNA

*Artemia* sp. yang digunakan bermerk Supreme Plus yang diproduksi oleh Golden Mark®, USA, dengan derajat penetasan (*hatching rate*) sekitar 80–90%. Siste *Artemia* sp. ditetaskan dalam botol air mineral terbalik dengan dinding berwarna gelap serta dilengkapi dengan sistem aerasi. *Artemia* sp. ditetaskan dengan salinitas 29 ppt selama 18–24 jam. *Artemia* sp. yang telah menetas dipisahkan

menggunakan penyaring dengan ukuran 150 mesh kemudian ditimbang sesuai dengan dosis yang akan diberikan ke ikan mas.

Satu ekor *Artemia* sp. mampu memakan bakteri sebanyak  $10^5$  cfu/mL (Lin *et al.*, 2007), sehingga diperlukan sepuluh ekor *Artemia* sp. untuk satu ekor ikan mas yang akan divaksinasi dengan dosis bakteri  $10^6$  cfu/mL. *Artemia* sp. yang sudah ditimbang sebanyak 3 mg untuk 20 ekor ikan mas dicampur dengan suspensi bakteri yang mengandung DNA vaksin Krt-GP-11. Selanjutnya larutan ditambahkan dengan PBS hingga kepadatan *Artemia* sp. 150 ekor/mL. Volume air yang harus dipenuhi untuk 20.000 ekor *Artemia* sp. adalah 134 mL, yaitu 5 mL suspensi bakteri dan 129 mL PBS. *Artemia* sp. direndam selama 90 menit dan diberi aerasi sedang.

### Vaksinasi

Penelitian ini menggunakan tiga buah akuarium yang berukuran  $30 \times 20 \times 25$  cm<sup>3</sup>. Akuarium tersebut digunakan untuk pemeliharaan ikan dengan perlakuan I, perlakuan II, dan kontrol (tidak diberi vaksin). Perlakuan I merupakan vaksinasi dengan frekuensi satu kali seminggu dan perlakuan II merupakan vaksinasi dengan frekuensi dua kali seminggu. *Sampling* tiap perlakuan dilakukan tiga hari setelah vaksinasi (Tabel 1).

Ikan mas dipuasakan selama 16 jam terlebih dahulu sebelum dilakukan vaksinasi. Pemberian vaksin dilakukan dengan memberikan *Artemia* sp. yang sudah dipisahkan beserta suspensi bakteri ke ikan mas. Volume air dalam akuarium sebelumnya dikurangi hingga 7/8 dari volume total. Penambahan air dilakukan 60 menit setelah pemberian vaksin.

### Isolasi DNA dan amplifikasi PCR

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *DNA extraction kit* (Genra, Minneapolis, USA). Jaringan ikan yang diambil yaitu bagian insang, ginjal, dan usus sekitar 5–20 mg. Jaringan yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang sebelumnya

telah diberi larutan *cell lysis solutions* sebanyak 200  $\mu$ L dan proteinase K 1,5  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama semalam.

Sampel yang telah diinkubasi didiamkan dalam suhu ruang  $\pm 10$  menit, setelah itu ditambahkan 1,5  $\mu$ L RNase (4 mg/mL). Sampel dikocok pelan sebanyak 30 kali, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama satu jam dan diangkat serta didiamkan pada suhu ruang selama  $\pm 10$  menit. Sebanyak 100  $\mu$ L *protein precipitation solution* ditambahkan ke dalam tabung mikro kemudian divorteks selama 30 detik. Kemudian disimpan *on ice* selama 10–15 menit. Setelah itu sampel disentrifugasi selama sepuluh menit pada suhu 4 °C, 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL baru yang sebelumnya telah diisi isopropanol 100% 300  $\mu$ L. Sampel dikocok perlahan  $\pm 50$  kali dan disentrifugasi selama sepuluh menit pada suhu 4 °C, 12.000 rpm. Supernatan dibuang dan ditambah 300  $\mu$ L 70% etanol (ETOH) dingin kemudian sampel disentrifugasi selama sepuluh menit, 4 °C, 12.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringudarkan sampai ETOH benar-benar kering. Setelah DNA kering ditambah dengan ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L, divorteks, dan disimpan pada suhu -20 °C.

Deteksi vaksin DNA pada organ ikan mas dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Primer yang digunakan merupakan primer spesifik untuk vaksin DNA GP-11 yaitu F81 (5'-TTAAGCGAGCAGTCCCCTCGGGTTCTT-3') dan R81 (5'-TTACCGGTATGGCCTCCACTTCAACCGCT-3'). Reaksi PCR yang digunakan, yaitu dengan volume 10  $\mu$ L yang mengandung 1  $\mu$ L LA Buffer; 1  $\mu$ L dNTPs mix; 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>; 1  $\mu$ L (1 pmol) masing-masing primer; 0,05  $\mu$ L LA *Taq polymerase* (Takara Bio, Shiga, Japan); 1  $\mu$ L DNA genom hasil ekstraksi. 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.

Tabel 1. Waktu pemberian vaksin dan *sampling* ikan mas *Cyprinus carpio*

	Hari ke-							
	Perlakuan 1				Perlakuan 2			
	9	12	16	19	9	12	16	19
Vaksin	■		■		■		■	
<i>Sampling</i>		■		■		■		■

Keterangan: *sampling* dilakukan sebelum ikan divaksinasi kembali pada hari yang sama.

### Elektroforesis

Agarosa 0,7% dituang pada cetakan sumur yang diinginkan. Setelah dingin, gel agarosa dimasukkan ke dalam wadah elektroforesis yang berisi larutan *buffer* elektroforesis dan mengandung etidium bromida (0,01 g/mL). Sampel DNA diambil 3  $\mu$ L dan dicampur dengan *loading buffer* 0,5  $\mu$ L, bila seluruh sampel telah dimasukkan ke dalam sumur, langkah terakhir adalah *marker* dimasukkan pada salah satu ujung sumur. Elektroforesis dilakukan  $\pm$ 30 menit, tegangan 200 volt, dan kuat arus 70 ampere.

Fragmen DNA produk PCR akan bergerak dari arah kutub negatif menuju kutub positif. Setelah DNA bermigrasi 75% dari bagian gel, aliran listrik dihentikan dan gel ditempatkan di atas *ultraviolet illuminator* untuk melihat visualisasi DNA. Gambar diambil menggunakan kamera digital Canon *Power Shot A640*.

### Isolasi RNA

Jaringan ikan yang masih hidup diambil sebanyak 25–50 mg dan dimasukkan ke dalam larutan isogen sebanyak 200  $\mu$ L. Jaringan tersebut digerus *on ice*. Jaringan digerus sampai hancur dan jika belum hancur ditambahkan isogen sampai volume akhirnya 800  $\mu$ L. Sampel didiamkan di suhu ruang selama lima menit untuk melisis jaringan. Jaringan yang telah lisis disentrifugasi selama sepuluh menit dengan kecepatan 12.000 rpm, 4 °C. Hasil dari sentrifugasi, larutan paling atas di dalam tabung mikro diambil menggunakan mikropipet untuk dipindahkan ke dalam tabung mikro baru yang sebelumnya telah diisi kloroform 200  $\mu$ L. Larutan divorteks selama 15 detik dengan kecepatan sedang kemudian sampel disimpan *on ice* selama dua sampai tiga menit setelah itu disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru (apabila terdapat tiga

lapisan dalam satu tabung mikro tersebut, maka diambil lapisan yang paling atas).

Sampel dimasukkan ke dalam tabung mikro baru yang sebelumnya telah diisi dengan isopropanol 400  $\mu$ L. Kemudian larutan divorteks pelan sampai homogen dan disimpan pada suhu ruang selama lima sampai sepuluh menit. Larutan disentrifugasi selama 15 menit, 12.000 rpm, 4 °C,. Supernatan dibuang kemudian larutan ditambah dengan ETOH 70% dingin sebanyak 1 mL. Larutan disentrifugasi selama 15 menit, 12.000 rpm, 4 °C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet RNA dikeringudarkan. Pelet RNA kering ditambah dengan larutan DEPC (20–50  $\mu$ L). Selanjutnya dilakukan perlakuan DNase ke dalam elusi RNA (Tabel 2).

Larutan yang telah dibuat kemudian divorteks dan di-*spin down*, serta diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu larutan ditambah dengan kloroform fenol sebanyak 450  $\mu$ L dan disentrifugasi selama sepuluh menit dengan kecepatan 12.000 rpm, 4 °C. Supernatan yang berwarna bening diambil sebanyak  $\pm$ 450  $\mu$ L dan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Larutan tersebut ditambah dengan etanol absolut sebanyak dua kali volume larutan (900  $\mu$ L), NaOAC 3 M (pH 5,2) sebanyak 10% larutan (45  $\mu$ L) dan glikogen 1  $\mu$ L. Sampel divorteks dan dimasukkan ke dalam alat pembeku -80 °C selama semalaman. Larutan diambil dari dalam alat pembeku dan disentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 15–30 menit, seluruh supernatan dibuang dan ditambahkan dengan larutan etanol 70% dingin. Larutan disentrifugasi kembali selama lima menit, 12.000 rpm, 4 °C dan seluruh pelet RNA dikeringudarkan pada suhu ruang. RNA yang sudah kering ditambahkan DEPC (elusi) 20  $\mu$ L lalu dihitung konsentrasi RNA dengan menggunakan GeneQuant®.

### Sintesis cDNA dan amplifikasi PCR

RNA dibuat dengan konsentrasi 3  $\mu$ g/30  $\mu$ L DEPC, kemudian divorteks dengan kecepatan rendah. Setelah itu sampel diinkubasi dalam suhu 65 °C selama sepuluh menit dan selanjutnya disimpan dalam es selama dua menit. RNA dipindahkan dari dalam es ke dalam tabung “*first strand reaction mix beads*” (*white tube*) yang berisi dua buah bola putih. Kemudian ditambah 3  $\mu$ L primer “dT3’RACE-VECT (1  $\mu$ g/3  $\mu$ L) lalu dibiarkan selama satu menit. Sampel divorteks dengan kecepatan rendah. Kemudian tabung mikro diinkubasi selama satu jam pada suhu 37 °C. Hasil dari cDNA ditambah dengan

Tabel 2. Larutan untuk perlakuan DNase

Bahan	Volume ( $\mu$ L)
Tris 1 M (pH 7,8)	18
NaCl 5 M	1
MgCl <sub>2</sub>	2,7
DTT 100 mM	4,5
DNase	3
RNase inhibitor	1
DEPC	Ditambahkan hingga volume total 450 $\mu$ L

SDW (*sterile distilled water*) sebanyak 50  $\mu$ L. cDNA yang didapat langsung digunakan untuk proses PCR. 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.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa vaksin DNA GP-11 masuk ke dalam organ target. Hal ini tampak pada visualisasi hasil PCR DNA seperti Gambar 1. Melalui hasil pemeriksaan visualisasi DNA dapat dilihat bahwa plasmid Krt-GP-11 tampak pada perlakuan G1-1, I1-1, U1-2, G1-2, I1-2, U2-2, G2-2, I2-2, G2-3, G1-3, I1-3. Namun pada minggu kedua, tidak seluruh sampel DNA organ tervisualisasi. Perlakuan I visualisasi hanya terdapat pada ginjal, sedangkan perlakuan II visualisasi terdapat pada ginjal dan insang.

Isolasi RNA dilakukan sebagai salah satu tahap pemeriksaan ekspresi plasmid Krt-GP-11 di tubuh ikan mas. Isolasi RNA dilakukan sepuluh hari setelah selesai pemberian vaksin. Organ yang diambil untuk isolasi RNA adalah ginjal. Sintesis cDNA berhasil dilakukan, hal ini dapat dilihat dari munculnya pita  $\beta$ -aktin sebagai kontrol internal. Ikan mas berumur tiga minggu mampu mengekspresikan gen GP-11 yang dapat terdeteksi setelah sepuluh hari pemberian vaksin pada organ ginjal di setiap perlakuan.

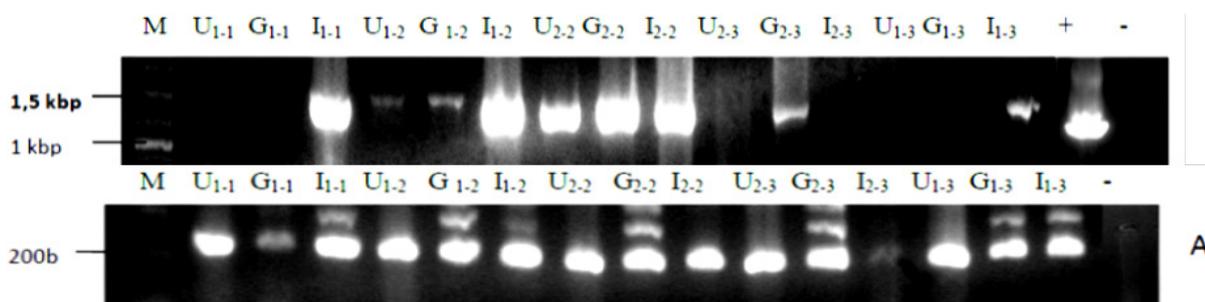
### Pembahasan

Serangan penyakit banyak terjadi pada stadia larva, yaitu ikan dengan ukuran kecil dan kepekaan yang tinggi, membuat vaksinasi dengan cara

injeksi dan perendaman tidak mungkin dilakukan (Lin *et al.*, 2007). Oleh karena itu vaksinasi secara oral melalui pakan alami bisa menjadi solusi pada larva ikan mas. Pemberian vaksin secara oral memiliki kendala yaitu antigen akan tercerna oleh enzim *gastrointestinal*, oleh karena itu antigen yang akan dimasukkan ke dalam tubuh ikan perlu dilindungi agar dapat sampai ke dalam usus ikan. Vaksin yang dimasukkan ke dalam tubuh *Artemia* sp. hidup diharapkan lebih aman, tidak menimbulkan stres pada ikan, dan mudah diterapkan oleh pembudidaya (Lin *et al.*, 2007). Agar vaksinasi yang dilakukan tidak menimbulkan stres pada ikan, maka vaksinasi secara oral lebih disarankan dibandingkan pemberian vaksin melalui perendaman maupun injeksi.

Dosis, ukuran, dan umur ikan memengaruhi kerja vaksin DNA, ikan lebih kecil mampu mengekspresikan vaksin DNA di beberapa jaringan (ginjal, limpa, dan otot) sedangkan ikan yang lebih besar hanya mengekspresikan vaksin DNA pada otot bekas suntikan (Gillund, 2008). Data lain menyebutkan bahwa ikan mas ukuran 10–15 g mampu mengekspresikan vaksin DNA pada jaringan insang, ginjal, limpa, dan otot dengan dosis 7,5  $\mu$ g melalui injeksi (Nuryati, 2010). Pada percobaan kali ini vaksin DNA sudah dapat diberikan pada benih ikan mas usia tiga minggu dengan dosis pemberian vaksin sebesar  $10^6$  cfu yang diberikan melalui *Artemia* sp. Keberhasilan pemberian vaksin DNA dapat terlihat di semua organ uji yaitu insang, ginjal, dan usus (Gambar 1).

Munculnya pita DNA pada minggu pertama membuktikan pernyataan Zheng *et al.* (2006) bahwa plasmid dapat terdistribusi tujuh hari setelah vaksinasi pada otot sekitar daerah injeksi, otot yang tidak terinjeksi, usus bagian belakang, insang, limpa, ginjal bagian depan, hati, dan gonad.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR DNA ikan mas *Cyprinus carpio* bervaksinasi. Keterangan: M: marker; U1-1, G1-1, I1-1: perlakuan I dan II, *sampling* pertama pada usus (U), ginjal (G), insang (I); U1-2, G1-2, I1-2: perlakuan I, *sampling* kedua pada usus (U), ginjal (G), insang (I); U2-2, G2-2, I2-2: perlakuan II, *sampling* kedua pada usus (U), ginjal (G), insang (I); U2-3, G2-3, I2-3: perlakuan II *sampling* ketiga pada usus (U), ginjal (G), insang (I); U1-3, G1-3, I1-3: perlakuan I, *sampling* ketiga pada usus (U), ginjal (G), insang (I); +: kontrol positif; -: kontrol negatif; A:  $\beta$ -aktin sebagai kontrol internal; perlakuan U1-1 G1-1 I1-1: perlakuan U2-1 G2-1 I2-1.

Variasi individu dan penyebaran vaksin Krt-GP-11 yang tidak merata pada organ menjadi salah satu faktor tidak tervisualisasinya seluruh DNA organ. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lorenzen dan LaPatra (2005) bahwa salah satu kekurangan vaksin DNA yaitu masih diperlukannya suatu strategi baru untuk melakukan vaksinasi secara massal. Pada percobaan ini dapat disimpulkan bahwa ikan mas mampu memvisualisasikan plasmid Krt-GP-11 yang diberikan melalui pakan *Artemia* sp.

Organ yang diambil untuk isolasi RNA adalah ginjal, karena organ ginjal merupakan organ yang paling sering muncul pada hasil visualisasi DNA (Gambar 1). Ginjal juga merupakan salah satu organ target serangan virus KHV selain organ insang, sehingga diharapkan pembentukan antibodi untuk melawan virus tersebut paling banyak terbentuk di organ ginjal. Kajian histopatologi pada ginjal, tampak jelas bahwa virus ini mengakibatkan inflamasi pada renal tubul ginjal dan mengakibatkan sel-sel yang terinfeksi mengalami pembentukan badan inklusi pada inti selnya. Kajian histopatologi insang ikan yang sakit menunjukkan bahwa terdapat sel-sel inflamasi di insang dan epitel insang mengalami hiperplasia (Pikarsky *et al.*, 2005).

Eksresi vaksin DNA dapat dilihat dari hasil sintesis cDNA (Gambar 2). Pita yang muncul pada sintesis cDNA membuktikan bahwa DNA yang ada di dalam inti sel mampu bertranskripsi sehingga menghasilkan mRNA. Proses transkripsi dapat terjadi karena promoter yang digunakan dalam konstruksi vaksin Krt-GP-11 memerintahkan DNA untuk memulai proses transkripsi. Promoter yang digunakan pada vaksin Krt-GP-11 adalah promoter keratin. Promoter keratin merupakan promoter yang diisolasi dari ikan *flounder* Jepang *Paralichthys olivaceus* (Hirono *et al.*, 2003). Keratin dipilih sebagai promoter dalam konstruksi vaksin Krt-GP-11 karena menurut Torma (2011) efektivitas promoter keratin tidak hanya terbatas

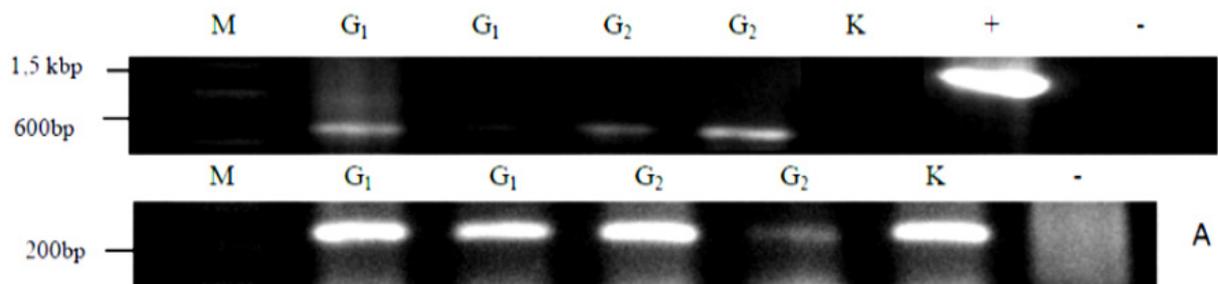
pada jaringan kulit dan epitel, tapi juga terdapat pada sel yang sedang berkembang dan sel saraf tertentu. Sementara Yazawa *et al.* (2005) menjelaskan bahwa promoter keratin dapat aktif di mana-mana atau tidak spesifik jaringan tertentu (*ubiquitous*) dan dapat aktif kapan saja diperlukan (*house keeping*).

Panjang pita pada sintesis cDNA tidak sesuai dengan panjang pita pada kontrol positif (Gambar 2). Pendeknya pita cDNA diduga akibat proses transkripsi mRNA terpotong sebagian kecil, hal ini dapat memengaruhi respons sistem imun yang terbentuk untuk melawan virus KHV. Untuk membuktikan kinerja dari ekspresi vaksin DNA Krt-GP-11 perlu dilakukan uji tantang pemberian virus KHV terhadap ikan yang telah diberi vaksin. Metode pemberian vaksin yang berbeda seperti dengan cara suntik, lewat pakan, *gen gun*, atau melalui perendaman dapat memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap respons sistem imun terhadap antigen yang masuk dan terhadap distribusi dari plasmid DNA (Zheng *et al.*, 2006).

Pemberian vaksin dengan cara perendaman *Artemia* sp. selama 90 menit dilakukan karena *Artemia* sp. bersifat pemakan segala atau omnivora. Makanan *Artemia* berupa plankton, detritus, dan partikel-partikel halus yang dapat masuk ke mulut (Anh *et al.*, 2009). Perendaman *Artemia* sp. bertujuan agar bakteri di dalam media cair dapat dimakan oleh *Artemia* sp. Pemberian vaksin menggunakan *Artemia* sp. dilakukan karena kandungan protein yang tinggi seperti yang dijelaskan oleh Anh *et al.*, (2009) bahwa *Artemia* sp. memiliki kandungan protein 52,50%, karbohidrat 14,80%, dan lemak 23,40%.

Kelebihan vaksinasi menggunakan *Artemia* sp. menurut Lin *et al.* (2007) adalah:

1. *Artemia* sp. merupakan *starter* pakan alami bagi larva ikan sehingga diharapkan vaksin dalam tubuh *Artemia* sp. cepat masuk ke dalam tubuh ikan mas.
2. Terdapat dua *bio-layer*, yaitu dinding sel *E.*



Gambar 2. Hasil sintesis cDNA. M: marker; G1: ginjal perlakuan 1; G2: ginjal perlakuan 2; +: kontrol positif; -: kontrol negatif; A:  $\beta$ -aktin sebagai kontrol internal.

*coli* dan kulit ari *Artemia* sp. yang melindungi dari enzim *gastrointestinal* sehingga vaksin dapat masuk ke dalam usus ikan mas.

3. Kuantitas antigen dalam *E. coli* rekombinan 1000 kali lipat lebih besar dibandingkan dengan *E. coli* alami, sehingga meningkatkan kuantitas antigen di setiap *Artemia* sp.

Vaksin yang diberikan pada ikan akan mengalami beberapa kemungkinan menurut Gillund *et al.* (2008), di antaranya adalah DNA akan 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. Hasil dari isolasi DNA menunjukkan bahwa vaksin DNA dapat divisualisasi pada organ ginjal, usus, dan insang. Visualisasi DNA pada organ tersebut membuktikan bahwa *Artemia* sp. mampu melindungi vaksin DNA yang ada di dalam tubuhnya.

Ikan mas mampu mengekspresikan plasmid Krt-GP-11 pada organ ginjal di setiap perlakuan. Pengujian ekspresi plasmid Krt-GP-11 dilakukan sepuluh hari setelah vaksinasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lin *et al.* (2007) bahwa pemeriksaan *immuno-histochemical* pada larva ikan *grouper* yang memakan *Artemia* sp. bervaksin VNN mampu membentuk antigen yang disebarkan dan masuk ke dalam organ usus bagian belakang ikan *grouper*, keberadaan antigen tersebut diharapkan mampu membentuk antibodi spesifik terhadap virus VNN. Pengujian tersebut dilakukan tujuh hari setelah vaksinasi dilakukan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Artemia* sp. memiliki potensi untuk dapat digunakan sebagai vektor dari vaksin plasmid GP-11. Pemberian vaksin ke benih ikan mas usia tiga minggu dilakukan dengan cara merendam *Artemia* sp. selama 90 menit dengan dosis bakteri  $10^6$  cfu dan frekuensi pemberian vaksin satu kali atau dua kali seminggu.

## DAFTAR PUSTAKA

Anh NTN, Hoa NV, Staphen GV, Sorgeloos P. 2009. Effect of different supplemental feeds on proximate composition and *Artemia* biomass production in salt ponds. *Aquaculture* 286:

217–225.

Gillund F, Dalmo R, Tonheim TC, Seternes T, Myhr AL. 2008. DNA vaccination in aquaculture-expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture* 284: 25–34.

Hedrick RP, Gilad O, Yun O, Spangenberg J, Marty R, Nordhausen M, Kebus M, Bercovier H, Eldar A. 2000. A herpes virus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health* 12: 44–55

Hirono I, Aoki T, Shimizu N, Takashima F. 2003. Immunorelated-genes of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. In: Hirono I, Aoki T, Shimizu N, Takashima F (eds). *Aquatic genomics*. Hlm. 286–300.

Leong JA. 1986. Evaluation of Sub Unit Vaccine to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. Oregon: Annual Report, Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildlife.

Lin CC, Jhon HYL, Ming SC, Huey LY. 2007. An oral nervous necrosis virus vaccine that induced protective immunity in larvae of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 268: 265–273.

Lorenzen N, LaPatra SE. 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Scientific and Technical Review of the Office International Epizooties*. 24: 201–213.

Nuryati S, Alimuddin, Sukenda, Damayanti R, Santika A, Pasaribu F, Sumantadinata K. 2010. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein gene and its expression towards increasing survival rate of KHV-infected common carp *Cyprinus carpio*. *Nature Indonesia* 13: 47–52.

Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Lovali-Sivan B, Hutoran M, Saphira Y, Steinitz M, Parelberg A, Soffe D, Kotler M. 2005. Pathogenesis of acute viral disease induce in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *Journal of Virology* 78: 9.544–9.551.

Sunarto A, Kusri E. 2006. Kasus kematian massal ikan mas di keramba jaring apung Danau Toba, Sumatra Utara [Abstrak]. *Media Akuakultur* 1: 00-00. <http://www.rca-prpb.com/content.php?id=%2052&page =Media-Akuakultur-Tahun-2006-Vol1-No1> [19 Juli 2012].

Sunarto A, Rukyani A, Itami I. 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpes virus in koi and carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Fisheries Research Agency, Yokohama, Japan*

- 86: 15–28
- Torma H. 2011. Regulation of keratine expression by retinoids. *Dermato-Endocrinology* 3: 136–140.
- Yazawa R, Hirono I, Aoki T. 2005. Characterization of promoter activities of four different Japanese flounder promoters in transgenic zebrafish. *Marine Biotechnology* 7: 625–633.
- Zheng FR, Sun XQ, Liu HZ, Zhang JX. 2006. Study on the distribution and expression of DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 261: 1.128–1.134.