

Produksi dan Aplikasi Vaksin DNA *Streptococcus iniae* untuk Meningkatkan Imunitas Nila (*Oreochromis niloticus*)

Production and Application of *Streptococcus iniae* DNA Vaccine to Increase Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Sutanti*, Novi Megawati, Sugiyo H. Pranoto & Ratu Siti Aliah

LAPTIAB BPPT Gd 612 Puspiptek Serpong Tangerang

Jl. MH. Thamrin No. 8, Serpong 15314

*Penulis untuk korespondensi, e-mail: tan_ti_new@yahoo.com

Abstrak

Vaksin DNA *Streptococcus iniae* adalah vaksin generasi ketiga yang mengandung gen penyandi antigen vaksin. Pgm adalah protein DNA-binding yang mengaktifkan ekspresi gen virulensi, termasuk polisakarida kapsul protein. Konstruksi gen pgm yang dikendalikan oleh promoter MBA telah berhasil dibuat dan merupakan kandidat vaksin DNA untuk mengendalikan infeksi *S. iniae* pada ikan nila. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk produksi dan aplikasi vaksin DNA *S. iniae* untuk meningkatkan imunitas ikan nila. Produksi vaksin dilakukan dengan metode isolasi plasmid dari bakteri *Escherichia coli* dH5 α yang membawa konstruksi pMBA-pgm. Verifikasi vaksin DNA dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer Fstrep dan Rstrep dengan ukuran target 1713 bp. Aplikasi vaksin DNA dilakukan pada dosis 25, 50,75, dan 100 ng/ml melalui metode suntik intraperitoneal dan ujiantang menggunakan bakteri *S. iniae* dengan kepadatan 10⁸ cfu/ml. Parameter yang diamati adalah persentase kelulushidupan (*Survival rate/ SR*), persentase RPS (*Relative Percentage Survival*), MTD (*Mean Time To Death*), keberadaan gen pgm, dan histologi organ hati, mata, otak, limpa dan ginjal. Produksi vaksin berhasil dilakukan menggunakan metode isolasi plasmid dan mengandung gen pgm dengan ukuran 1713 bp. Aplikasi vaksin DNA *S. iniae* menunjukkan bahwa dosis vaksin optimal adalah 50 ng/ml dengan nilai SR 96,667%; nilai RPS 88,461% dan MTD 4,6 hari. Histologi ikan nila yang terinfeksi *S. iniae* menunjukkan mata ikan nila mengalami opacity dan exophthalmia serta jaringan organ (hati, limpa dan ginjal) mengalami necrosis. Vaksin DNA telah berhasil diproduksi menggunakan metode isolasi plasmid dan telah diaplikasikan pada ikan nila dengan dosis optimum 50 ng/ml.

Kata kunci: Gen pgm, CfecW\ fcm]g n]`ch]W i g, GhfephcWcWW i g]n]Ue, vaksin DNA

Abstract

DNA vaccine *Streptococcus iniae* is a third generation of vaccines based on the gene encoding a vaccine antigen. Phosphoglucosyltransferase (pgm) is a DNA-binding protein that activates expression of several important virulence genes, including those encoding polysaccharide capsule. The pgm gene controlled by MBA (medaka beta actin) promoter has been constructed successfully as a candidate for DNA vaccine against *S. iniae* infection in Nile tilapia. The goals of this study were to produce and apply of *S. iniae* DNA vaccine to increase the Nile tilapia immunity. Vaccine production was conducted using plasmid isolation method from *Escherichia coli* dH5 α containing pMBA-pgm. Vaccine verification was accomplished by PCR using pgm gene *S. iniae* Fstrep and Rstrep specific primers. Application of DNA vaccine was using 25, 50, 75, and 100 ng/ml dosage with intraperitoneal injection method. The challenge test after 1 month of vaccination was using 10⁸ cfu/ml density of *S. iniae* with intraperitoneal injection method. Observation test parameter was survival rate, relative percent survival, mean time to death, the existence of pgm gene, and organ histology of eyes. Vaccine production was successful using plasmid isolation method and containing pgm gene revealed 1713 bp. The application of DNA vaccine was optimum at 50 ng/ml dosage with SR value 96.667%, RPS value 88.461% and MTD value 4.6 days. The eyes show opacity and exophthalmia. The DNA vaccine was optimum at 50 ng/ μ l dosage.

Keywords: Pgm gene, CfecW\ fcm]g n]`ch]W i g, GhfephcWcWW i g]n]Ue, DNA vaccine

Pengantar

Vaksin DNA memiliki beberapa keuntungan dibandingkan vaksin konvensional. Pada umumnya vaksin konvensional tergantung pada terbentuknya

antibodi dalam mencegah penyakit infeksi. Namun demikian vaksin konvensional tidak mampu merangsang respon imun selular. Vaksin DNA selain dapat merangsang respon imun humoral melalui

menggunakan *agarose gel* 0,8%. Konsentrasi DNA diukur menggunakan mesin Nanodrop. Hasil isolasi plasmid kemudian diverifikasi dengan metode PCR. Metode PCR (*Polimerase Chain Reaction*) menggunakan primer spesifik Fstrep untuk primer *forward* dan Rstrep untuk primer *reverse* dengan target berukuran 1713 bp. Komposisi PCR adalah 1µL DNA genom bakteri, 1x buffer taq, 2mM dNTP mix, 20 pmol primer *forward*, 20 pmol primer *reverse*, 2U enzim dream taq polimerase (Fermentas), dan ddH₂O dengan volume reaksi 10 µl. PCR dilakukan pada kondisi pra PCR 95 °C 5 menit, denaturasi 95 °C 30 detik, penempelan primer pada 42,5 °C, 30 detik dan pemanjangan 72 °C, 1 menit, dengan 30 siklus, dan pasca PCR pada 72 °C 5 menit, diikuti dengan 15 °C selama 10 menit.

Aplikasi Vaksin DNA pada ikan Nila

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (CRD = *Completely Randomized Design*) yang terdiri dari 4 perlakuan dengan 3 ulangan pada masing-masing metode vaksinasi meliputi:

Metode Vaksinasi melalui injeksi

- Perlakuan 1 : Kontrol (K), tidak divaksin
- Perlakuan 2 : Vaksinasi dengan melalui injeksi dosis vaksin DNA 25 ng/µl
- Perlakuan 3 : Vaksinasi dengan melalui injeksi dosis vaksin DNA 50 ng/µl
- Perlakuan 4 : Vaksinasi dengan metode injeksi dosis vaksin DNA 75 ng/µl
- Perlakuan 5 : Vaksinasi dengan metode injeksi dosis vaksin DNA 100 ng/µl

Ikan nila yang digunakan berukuran 7 - 8 cm dengan jumlah 100 ekor per bak. Vaksinasi diinjeksikan sebanyak 100 µl setiap ikan. Vaksinasi hanya dilakukan 1x tanpa booster. Penentuan dosis didasarkan pada Yasuie *et al.* (2010) yang menggunakan dosis 1-10 µg plasmid vaksin DNA. Kepadatan bakteri yang digunakan adalah 10⁸ cfu/ml. Uji *Tantang* dilakukan dengan menginfeksi *S. iniae* terhadap ikan nila yang telah divaksin. Infeksi ini dilakukan 1 bulan setelah vaksinasi dosis 0,1 ml /ikan secara intraperitoneal. Gejala penyakit eksternal yang timbul pada ikan nila diamati dan jumlah ikan yang mati pada akhir pengamatan dicatat, selanjutnya menghitung nilai SR, dan RPS.

Laju sintasan atau SR (*Survival Rate*), dihitung berdasarkan rumus:

$$SR = \frac{Nt}{No} \times 100\%$$

Keterangan :

Nt : jumlah ikan hidup pada akhir penelitian

No : jumlah ikan pada awal penelitian

Tingkat Perlindungan Relatif (*Relatif Percent Survival*

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ kematian ikan yang divaksin}}{\% \text{ kematian ikan yang tidak divaksin}} \right) \times 100\%$$

= RPS)

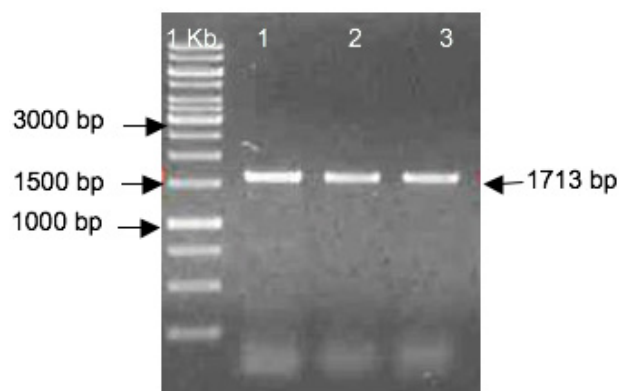
Histologi organ mata ikan nila

Sampel yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi adalah sampel mata ikan nila yang menunjukkan gejala *exophthalmia*. Sampel mata difiksasi dalam larutan formalin 10% selama 24 jam, setelah itu dilakukan dehidrasi dengan memasukkan sampel ke dalam larutan alkohol berseri mulai dari 70%, 80%, 90% dan alcohol absolute masing-masing selama 1 jam. Sampel dimasukkan ke dalam alcohol-xylol (1:1) selama 1 jam dan dimasukkan ke dalam xylol murni 1, 2, 3 selama 1 jam. Infiltrasi paraffin dilakukan dengan memasukkan sampel ke campuran xylol-paraffin (1:1) selama 1 jam dan dimasukkan ke paraffin 1, 2, 3 murni selama 1 jam. Proses infiltrasi dilakukan dalam oven dengan suhu 60 °C. Sampel ditanam pada blok paraffin dan dibiarkan hingga membeku. Sampel dipotong menggunakan mikrotom setebal 5 µm. pita paraffin hasil potongan diletakkan dalam *water bath* dengan suhu 45 °C dan ditempelkan pada kaca preparat yang telah diolesi putih telur sebagai perekat. Sampel tersebut agar dapat diwarnai dengan zat warna yang larut dalam air, maka dilakukan proses hidrasi. Gelas objek yang berisi jaringan kemudian dimasukkan berturut-turut ke dalam petroleum benzene, xylene, alkohol 100% (1), alkohol 100% (2), alkohol 95%, alkohol 85%, alkohol 70% , alkohol 60% masing-masing selama 3 menit dan dicuci dengan akuades. Pewarnaan menggunakan Haematoxylin selama 10 - 30 menit dan dicuci dengan air kran mengalir pelan selama 5 - 20 menit serta bilas dengan akuades. Kemudian pewarnaan dengan Eosin selama 3 - 5 menit dan cuci dengan akuades. Sesudah dicuci, kembali dilakukan dehidrasi agar selanjutnya dapat direkatkan dengan gelas penutup dan zat perekat (*mounting medium*), dengan cara memasukkan gelas objek dan jaringannya ke dalam alkohol 70%, alkohol 80%, dan alkohol 95% masing-masing selama 5 detik. Kemudian dimasukkan ke dalam etanol, larutan creosote-xylene (1:1) dan xylene masing-masing selama 3 menit. Preparat dan jaringan di atasnya ditetesi dengan canada balsam atau entellan dan langsung ditutup dengan gelas penutup dan biarkan hingga kering. Preparat jaringan dapat diamati di bawah mikroskop.

Hasil dan Pembahasan

Kandidat vaksin DNA *S. iniae* yang berupa koloni yang mengandung plasmid berjumlah 3 koloni. Masing-masing plasmid dari 3 koloni tersebut telah berhasil dilakukan pengukuran konsentrasi sebesar 121.2 - 199.6 ng/ul dan memiliki kemurnian yang baik dengan kisaran perbandingan A260/280 adalah 1.945 - 2.044. Kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1.8 - 2.00 (Sambrook *et al.*, 1999). Gen virulen pada konstruksi vaksin DNA telah diisolasi dari gen virulen *S. iniae*. Bakteri tersebut merupakan bakteri lokal yang diisolasi dari organ otak ikan sakit di lingkungan budidaya ikan nila Jawa Barat. Vektor pMBA memiliki promoter beta actin ikan medaka (*Oryzae latives*), promoter ini telah berhasil digunakan untuk proses transgenik pada ikan transgenik medaka, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dan ikan nila (*O. niloticus*). Promoter β -actin medaka dapat terekspresi di berbagai jaringan termasuk otot (Kobayashi *et al.*, 2007). Vektor yang digunakan sebagai pembawa gen *pgm* telah berhasil digunakan sebagai vektor pembawa gen glikoprotein 25 pada vaksin DNA untuk penyakit KHV (*Koi Herpes Virus*) (Nuryati *et al.*, 2010).

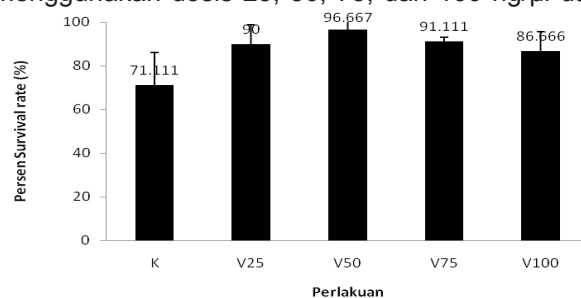
Salah satu tahapan dalam produksi vaksin DNA adalah verifikasi plasmid. Tahapan ini bertujuan untuk mendeteksi apakah plasmid yang diisolasi membawa gen *pgm S. iniae*. Tiga sampel plasmid berhasil diamplifikasi menggunakan primer tersebut. Hasil amplifikasi kemudian divisualisasi menggunakan gel agarose konsentrasi 0,8% dan diinterpretasi menggunakan *gel documentation* (Gambar 1). Produksi vaksin DNA *Streptococcus* dilakukan setelah konstruksi vaksin DNA terverifikasi. Produksi vaksin skala 1000 ml menggunakan metode *lysis by alkali*



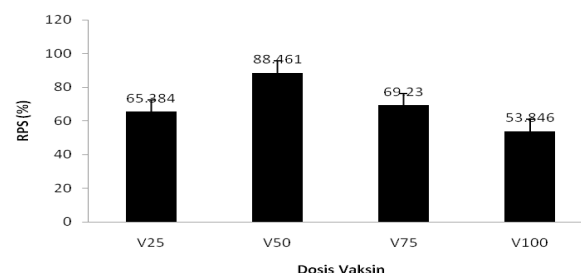
Gambar 1. Hasil amplifikasi sampel plasmid, visualisasi menggunakan gel agarose konsentrasi 0,8% dan interpretasi menggunakan *gel documentation*. Keterangan: 1kb=marka DNA ladder; 1,2, dan 3 = hasil PCR sampel plasmid.

(Sambrook *et al.*, 1999). Isolat vaksin dikultur pada media SOB 1000 ml dan ditambahkan antibiotik kanamisin konsentrasi 20 mg/ml. Produksi vaksin pada media kultur 1000 ml akan menghasilkan rata-rata konsentrasi plasmid 7500 ng/ul dengan purifikasi 1.8 - 2.0 pada absorbansi A260/A280. Menurut Goodwin *et al.* (2007) nilai kemurnian genom lebih besar dari 2.0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA, sedangkan nilai lebih kecil dari 1.8 menunjukkan adanya kontaminasi protein.

Uji tantangan dilakukan dengan menginfeksi *S. iniae* ke ikan yang telah divaksin. Dosis bakteri tersebut adalah 1.10^8 cfu/ikan dengan volume 0,1 ml. Hasil pengamatan SR (*Survival Rate*) yaitu tingkat kelulushidupan ikan nila yang telah divaksin menggunakan dosis 25, 50, 75, dan 100 ng/ul dan

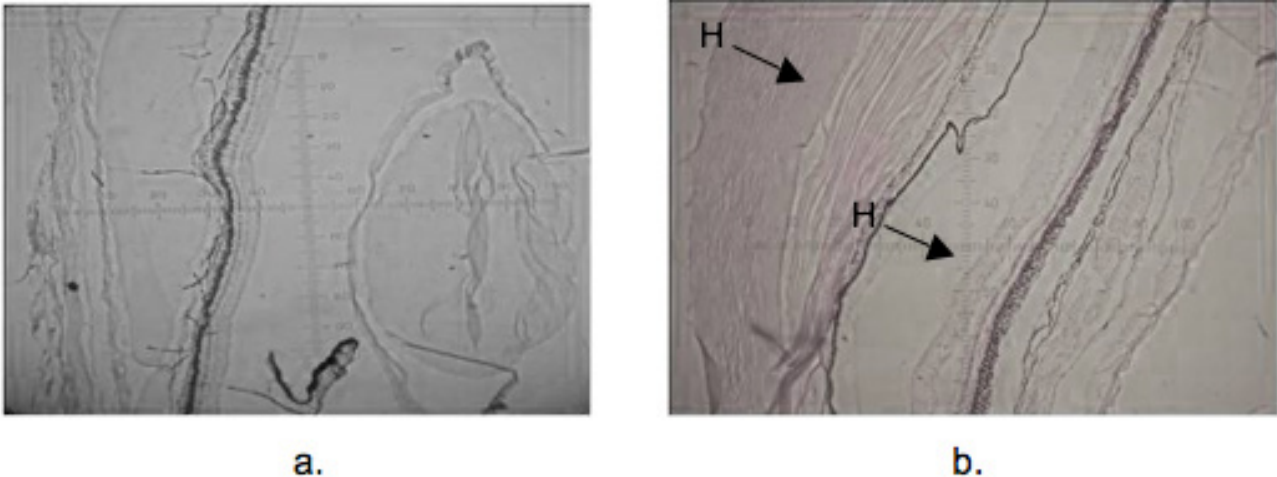


Gambar 2. Persentase *survival rate* pada ikan nila.



Gambar 3. Nilai RPS (*Relative Percentase Survival*).

Pengamatan terhadap kecepatan kematian ikan setelah dilakukan infeksi bakteri *S. iniae* dilakukan setiap hari hingga terpenuhi LD50. Nilai rata-rata waktu kematian atau MTD (*Mean Time to Death*) diperoleh waktu kematian tercepat terjadi pada ikan nila yang divaksin dengan dosis 50 ng/ml dengan waktu rerata kematian 4,6 hari. Sedangkan kematian perlakuan lain dan kontrol antara 7,6 hingga 8 hari. Gejala klinis infeksi *S. iniae* adalah kehilangan keseimbangan, letargik, ulcer, exophthalmia dan berenang memutar. Hasil histologi organ mata ikan nila sehat dan ikan nila yang terinfeksi *S. iniae* dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan Gambar 4, mata ikan nila yang terinfeksi bakteri menunjukkan kelainan fungsi sel yang ditandai dengan perubahan bentuk. Mata mengalami pembesaran volume organ atau jaringan akibat pembesaran komponen sel. Menurut



Gambar 4. Histopatologi organ mata ikan nila; a. mata ikan nila normal, b. mata ikan yang mengalami exophthalmia karena infeksi *S. iniae*.

Keterangan: H: kerusakan jaringan hiperplasia.

Hardi (2011), reaksi dari sel, jaringan atau organ terhadap agen perusak dapat berbentuk adaptasi, penyesuaian terhadap rangsangan fisiologik atau patologik tertentu, seperti adanya reaksi berupa hipertropi (peningkatan volume organ atau jaringan akibat pembesaran komponen sel), hiperplasia (peningkatan abnormal jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan), hiperemi, dan atrofi.

Beberapa penelitian tentang vaksin DNA yang telah dilakukan adalah Corbeil *et al.* (2000) yang menggunakan vaksin plasmid DNA ipLHNw-G dengan dosis rendah sebesar 1-10 ng per ikan mampu memberikan perlindungan pada benih ikan rainbow trout terhadap iHNW WRAC strain heterolog. Pada penelitian ini dosis optimum aplikasi vaksin DNA *S. iniae* adalah 50 ng/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan tilapia yang diberi vaksin konvensional anti *S. iniae* mencapai tingkat kelangsungan hidup sebesar 86,5% sedangkan ikan yang tidak divaksinasi hanya 32% (Clark *et al.*, 2002).

Vaksin DNA yaitu vaksin yang dibuat dari DNA (gen) yang menyandi protein imunogenik dari suatu patogen di kloning ke dalam plasmid dan plasmid ini kemudian disuntikkan ke ikan. Gen akan terekspresi secara extrachromosomal (di luar kromosom ikan) untuk memproduksi protein imunogenik yang merangsang sistem kekebalan ikan dan melindungi ikan dari serangan penyakit. Beberapa contoh aplikasinya adalah plasmid yang mengandung gen penyandi glikoprotein dan nukleokapsid protein terbukti dapat melindungi ikan dari serangan virus *infectious hematopoietic necrosis* (IHN), *viral haemorrhagic septicemia* (VHS), dan *koi herpes virus* (KHV) (Tonheim *et al.*, 2008). Vaksin DNA memiliki beberapa

keunggulan diantaranya proses produksi yang relatif murah, kemudahan penyimpanan karena plasmid DNA memiliki stabilitas kimia yang tinggi, modifikasi yang cepat dari vaksin DNA untuk melawan patogen mutan, tidak membutuhkan *boosting* (vaksinasi ulang) dan efektif dalam memacu sistem imun humoral dan *cell mediated immunity* serta aman digunakan bagi ikan (Zheng *et al.*, 2006)

Kesimpulan

Produksi Vaksin DNA *S. iniae* telah berhasil dilakukan dari konstruksi pMBA-pgm dengan rata-rata konsentrasi plasmid 7500 ng/ul. Dosis optimum aplikasi vaksin adalah 50 ng/ul per 100 ul atau setara 5 µg dengan metode injeksi intraperitoneal.

Saran

Perlu dilakukan aplikasi vaksin DNA pada skala lapang.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kami ucapkan kepada tim perikanan LAPTIAB BPPT.

Daftar Pustaka

Austin, B & D.A. Austin. 1999. Chapter 2-Characteristics of the diseases. In Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. 13-15p.

- Buchanan, J.T., A. Stannard., X. Lauth., V.E. Ostland., H.C. Powell., M.E. Westerman & V. Nizet. 2005. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and immunity*. (73): 6935-6944.2817-2824.
- Clark, J.S., B. Paller & P.D. Smith. 2002. Prevention of streptococcus in tilapia by vaccination: the Philippine. Experience.ag.arizona.edu/azaqua/ista/editedpapers/H&D-%Streptococcus/Clark. Diakses 15 Maret 2013.
- Corbeil, S.E., E.D. Lapatra, G. Anderson & Kurath. 2000. Nanogram quantities of DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious haematopoietic necrosis virus vaccine 18.
- Donnelly, J.J., M. A. Liu & J.B. Ulmer. 2000. Antigen presentation and DNA vaccine. *Respir Crit Care Medical*. (162): S190-193.
- Eyngor, M, Y. Tekoah, R. Shapira, A. Hurvitz, A. Zlotkin, A. Lublin & A. Eldar. 2008. Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains. *J. Applied and Environmental Microbiology*. 74(22): 6892-6897.
- Goodwin, W., A. Linarce & S. Hadi. 2007. An introduction to forensic genetics. John Wiley & Sons Ltd, Chichester: x + 169p.
- Hardi, E.H. 2011. Kandidat vaksin potensial *Streptococcus iniae* untuk pencegahan penyakit Streptococcosis pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Isbagio, D.W. 2005. Masa Depan Pengembangan Vaksin Baru. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 148. 12p.
- Kobayashi, S., Alimuddin, T. Morita, M. Miwa, J. Lu, M. Endo, T. Takeuchi & G. Yoshizaki. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*. 270(2007): 427-435.
- Locke, J.B., R.K Aziz, M.R. Vicknair, V. Nizet & J.T. Buchanan. 2006a. *Streptococcus iniae* M-Like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS ONE*. 3(7): e2824.
- Locke, J.B., R.K Aziz, M.R. Vicknair, V. Nizet & J.T. Buchanan. 2006b. *Streptococcus iniae* capsule impairs phagocytic clearance and contributes to virulence in fish. *Journal of Bacteriology*. 189: 1279-1287.
- Locke, J.B., R.K Aziz, M.R. Vicknair, V. Nizet & J.T. Buchanan. 2006c. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and Immunity*. (73): 6935-6944.
- Nuryati, S., Alimuddin, Sukenda, R. Damayanti, A. Santika, F. Pasaribu & K. Sumantadinata. 2010. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein gene and its expression towards increasing survival rate of KHV-infected common carp (*Cyprinus carpio*). *Natur Indonesia*. 13(1): 47-52.
- Radji, M. 2009. Vaksin DNA: Vaksin generasi keempat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 4(1): 28-37
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1999. *Molecular Cloning*. Second Edition. Cold Springs Harbor Laboratory. New York. 142p.
- Tonheim, T.C., B. Jarl & A.D. Roy. 2008. What happen to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunology*. 25(1):1-28.
- Yasuike, M, H. Kondo, I. Hirono & T. Aoki. 2010. Gene expression profile of HIRRV.G and N protein gen vaccinated Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* during HIRRV infection. *Microbiology and Infectious Diseases* 34:103-110.
- Zheng, F.R., X. Sun, H. Liu & J.X. Zhang. 2006. Study on distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese Flounder. *Elsevier J. Aquaculture*. 26: 1128-1134.