

Uji potensi transmisi vaksin GP25 pada bakteri flora normal media budidaya ikan mas

Potential transmission test of GP25 vaccine in normal flora bacteria of common carp culture media

Sri Nuryati*, Alimuddin, Ayu Dhita Juliadiningtyas

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 virus that infects common carp and koi *Cyprinus carpio*. KHV attacks most stadia of common carp and koi and causes mortality up to 80–95% of the population. One way to prevent the spread of KHV is by applying DNA vaccine. This research was conducted to test potential transmission of DNA vaccine encoding glycoprotein 25 (vaccine GP25) toward normal flora bacteria of media cultivation of common carp. Bacteria was isolated from pond water of common carp and tested for their sensitivity to ampicillin. Research was performed by adding vaccine GP25 to ampicillin-sensitive bacteria at a dose of 12.5 µg/100 µL and incubated at 28 °C for 30, 60, 180, and 300 minutes then plated on media containing ampicillin. The grown bacteria cells were tested for the existence of plasmid bearing gen GP25 through bacteria colony cracking. The results of this research showed that there was no bacteria contained plasmid bearing gen GP25.

Keywords: DNA vaccines, common carp, vaccine safety

ABSTRAK

Koi herpesvirus (KHV) merupakan virus yang menginfeksi ikan mas dan koi *Cyprinus carpio*. KHV menyerang hampir semua stadia ikan mas dan koi dan menyebabkan kematian hingga 80–95% dari populasi. Salah satu cara penanggulangan penyebaran KHV adalah dengan penggunaan vaksin DNA. Penelitian ini dilakukan untuk menguji potensi transmisi vaksin DNA glikoprotein 25 (vaksin GP25) pada bakteri flora normal pada media budidaya ikan mas. Bakteri diisolasi dari kolam budidaya ikan mas dan diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik ampisilin. Penelitian dilakukan dengan menambahkan vaksin GP25 ke larutan bakteri sensitif ampisilin dengan dosis 12,5 µg/100 µL dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 30, 60, 180, dan 300 menit kemudian disebar pada media mengandung antibiotik ampisilin. Sel bakteri yang tumbuh diuji untuk mendeteksi keberadaan plasmid pembawa gen GP25 dengan menggunakan metode seleksi koloni bakteri (*colony cracking*). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada bakteri yang mengandung plasmid pembawa gen GP25.

Kata kunci: keamanan vaksin, ikan mas, vaksin DNA

PENDAHULUAN

Wabah *koi herpes virus* atau KHV mulai diketahui terjadi awal tahun 1995–1996. Namun menurut Hedrick *et al.* (2005) KHV mulai lebih dikenal ketika diakui secara formal oleh Jerman pada tahun 1997 dan belum diidentifikasi sampai dengan tahun 1998. KHV dilaporkan menyebabkan kematian yang tinggi pada jenis ikan koi dan ikan mas di Israel dan USA (Pokorova *et al.*, 2005). Wabah KHV diduga masuk ke Indonesia melalui ekspor ikan koi yang berasal dari Hongkong dan terjadi sejak bulan Maret pada

tahun 2002 di daerah Blitar Jawa Timur (Sunarto *et al.*, 2005).

Penyakit KHV menyebabkan kematian massal dengan mortalitas 80–95% untuk kedua jenis ikan tersebut dan menyebabkan kerugian yang mencapai miliaran rupiah (Sunarto *et al.*, 2005). KHV diketahui menyebabkan kerusakan pada kulit dan insang pada koi dan ikan mas. Ikan yang terkena KHV akan berenang secara acak dengan frekuensi pernapasan yang tinggi, insang bengkak, dan terjadi kerusakan pada kulit. Faktor yang memengaruhi tingkat kerusakan menurut Pokorova *et al.* (2005) adalah suhu. Ikan akan

semakin rentan terhadap penyakit ini pada suhu air 18–28 °C.

Tingkat mortalitas yang tinggi mendorong upaya pencegahan terhadap penyakit KHV. Salah satu cara penanggulangan dan pencegahan terhadap KHV adalah dengan vaksinasi. Vaksin merupakan antigen dari suatu jasad patogen yang telah dilemahkan sifat patogennya yang akan merangsang sistem imun dengan cara meningkatkan kekebalan ikan dari infeksi patogen. Vaksin yang digunakan dapat berupa vaksin DNA. Menurut Nuryati *et al.* (2010b), vaksin DNA efektif digunakan untuk meningkatkan kekebalan spesifik pada ikan. Metode pemberian vaksin dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu melalui suntikan (*injection*), pakan (oral), dan perendaman (*immersion*). Setiap metode memiliki kelebihan dan keterbatasan. Metode melalui suntikan lebih efektif dalam memasukkan vaksin ke dalam tubuh ikan dibandingkan melalui pakan dan perendaman, namun memiliki kekurangan jika diterapkan pada jumlah ikan yang banyak misalnya dalam kegiatan budidaya.

Metode vaksinasi melalui pakan telah diuji efektif memasukkan vaksin ke dalam tubuh ikan dan dapat diterapkan dalam jumlah ikan yang banyak. Penerapan vaksin dalam pakan telah dilakukan dengan metode pencampuran pakan dalam pakan buatan dan pakan alami. Kekurangan dalam metode ini adalah dibutuhkan vaksin dalam jumlah banyak untuk dicampurkan dalam pakan, yang mengakibatkan tingginya biaya yang dikeluarkan dan kerugian apabila pakan mengandung vaksin yang tidak termakan oleh ikan.

Menurut Lorenzen dan LaPatra (2005) salah satu kekurangan vaksin DNA yaitu masih diperlukannya suatu strategi baru untuk vaksinasi secara massal. Metode yang diuji selanjutnya adalah melalui perendaman. Metode ini memiliki kelebihan dalam penanganan objek ikan yang akan divaksin yaitu tidak mengakibatkan stres saat penanganan dan menghemat tenaga dalam pemberian vaksin. Metode perendaman dilakukan dengan mencampurkan vaksin DNA pada wadah berisi media budidaya dan objek ikan. Pemberian vaksin DNA yang merupakan produk rekayasa genetika (PRG) dikhawatirkan memiliki dampak pada lingkungan. Dampak ini berikutnya dikhawatirkan dapat mengganggu kesehatan ikan, hewan, dan manusia. Salah satunya adalah bakteri flora normal dalam perairan pemeliharaan ikan budidaya. Uji potensi transmisi vaksin GP25 pada bakteri flora normal media budidaya ikan mas

secara *in vitro* telah diuji dalam penelitian ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji potensi transmisi vaksin GP25 pada bakteri flora normal media budidaya ikan mas *Cyprinus carpio* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Isolasi bakteri flora normal media budidaya

Bakteri asal air kolam budidaya ikan mas diisolasi dari Kolam Percobaan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Isolat bakteri air kolam dibiakkan dalam media agar LB-Tripton. Sampel air kolam budidaya ikan mas disebar pada media agar LB-Tripton sebanyak 100 µL dengan pengenceran 10^{-2} dan 10^{-3} kemudian disebar merata pada permukaan media menggunakan siku penyebar. Hasil penyebaran diinkubasi pada suhu ruang 28 °C selama sekitar 18 jam. Hasil pertumbuhan isolat bakteri asal air diambil menggunakan tusuk gigi steril dan digoreskan pada media LB-Tripton untuk mendapatkan koloni tunggal. Pemilihan bakteri dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang berbeda dan memiliki sifat dominan.

Pewarnaan Gram

Uji identifikasi pertama adalah pewarnaan Gram dengan tujuan mendapatkan jenis Gram isolat bakteri air kolam budidaya ikan mas. Isolat bakteri diambil menggunakan ose dan dioleskan pada permukaan gelas preparat kemudian ditambahkan air satu tetes dan dipanaskan 10 cm di atas bunsen. Hal ini bertujuan untuk melekatkan isolat bakteri pada gelas preparat.

Pewarnaan pertama menggunakan larutan kristal ungu violet yang ditetaskan pada isolat bakteri yang sebelumnya telah dilekatkan pada gelas preparat. Tetesan didiamkan selama satu menit kemudian dibilas menggunakan akuades dan dikeringanginkan. Setelah kering kemudian preparat bakteri ditetaskan menggunakan larutan lugol iodine dan didiamkan selama satu menit kemudian dibilas kembali menggunakan akuades dan dikeringudarkan kembali. Tahap selanjutnya dengan meneteskan alkohol absolut selama 30 detik dan dibilas kembali menggunakan akuades dan dikeringudarkan. Tahap terakhir adalah dengan meneteskan larutan safranin selama 30 detik kemudian kembali dibilas menggunakan akuades dan dikeringudarkan. Isolat yang telah melalui tahap pewarnaan kemudian diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 1.000 kali dengan minyak imersi.

Uji sensitivitas bakteri terhadap ampisilin

Isolat bakteri air kolam budidaya dan *A. hydrophila* diuji sensitivitasnya terhadap antibiotik ampisilin. Uji sensitivitas dengan mengoleskan isolat bakteri dan *A. hydrophila* menggunakan tusuk gigi steril pada media LB-Tripton yang ditambahkan antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 100 mg/mL media. Kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama sekitar 18 jam. Isolat yang sensitif terhadap ampisilin digunakan sebagai bahan uji selanjutnya.

Vaksin GP25

Vaksin GP25 merupakan plasmid pembawa gen GP25 KHV. Plasmid ini berasal dari bakteri *E. Coli* DH5- α terkonstruksi yang ditumbuhkan pada media mengandung ampisilin. Terdapat gen GP25 dan gen pembawa sifat resisten terhadap ampisilin dalam plasmid ini.

Rancangan penelitian

Perlakuan berupa penambahan plasmid (vaksin DNA) GP25 pada isolat bakteri yang telah lulus uji sensitivitas ampisilin (isolat A, B, D, G, dan I) dan masa inkubasi (30, 60, 180, dan 300 menit). Sebagai kontrol positif, digunakan bakteri *Bacillus* sp. dengan penambahan vaksin GP25 dan inkubasi selama 30, 60, 180, dan 300 menit, sedangkan kontrol negatif adalah bakteri *Bacillus* sp. tanpa penambahan vaksin GP25 dan inkubasi selama 30, 60, 180, dan 300 menit.

Isolat bakteri diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL yang berisi PBS steril 1 mL. Vaksin GP25 ditambahkan ke dalam tabung mikro tersebut hingga mencapai konsentrasi 12,5 μ g/100 μ L dan dihomogenkan menggunakan vorteks lalu inkubasi pada suhu 28 °C selama 30, 60, 180, dan 300 menit. Hasil inkubasi diambil sebanyak 100 μ L menggunakan pipet mikro dan disebar dengan siku penyebar pada media LB-Tripton yang mengandung ampisilin, dan diinkubasi kembali selama 18 jam pada suhu 28 °C.

Deteksi plasmid GP25 dalam *A. hydrophila* dan isolat bakteri air kolam

Deteksi adanya plasmid pada *A. hydrophila* dan isolat bakteri air kolam yang telah ditambahkan dengan vaksin GP25 di media LB-Tripton yang mengandung ampisilin dilakukan dengan metode *colony cracking*. Pemecahan (*cracking*) sel bakteri dimulai dengan pengambilan koloni tunggal bakteri yang tumbuh pada media LB-Tripton yang ditambahkan dengan ampisilin

menggunakan tusuk gigi steril. Koloni bakteri digoreskan pada dasar tabung mikro 1,5 mL. Tahap selanjutnya adalah dengan menambahkan 10 mM EDTA sebanyak 10 μ L pada satu sisi dinding tabung mikro berisi bakteri, dan *cracking buffer* (CB) sebanyak 10 μ L pada sisi dinding tabung mikro yang lain kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks.

Setelah 10 mM EDTA dan *cracking buffer* homogen pada dasar tabung mikro dilanjutkan dengan penambahan kembali *loading cracking buffer* (LCB) sebanyak 10 μ L pada bagian tutup tabung mikro. Larutan dihomogenkan kembali menggunakan vorteks dan diinkubasi suhu ruang selama lima menit. Tabung mikro berisi bakteri dan larutan *cracking* disentrifugasi kemudian di-vorteks kembali hingga larutan *cracking* keruh kemudian dimasukkan ke dalam wadah berisi es dan diinkubasi selama lima menit.

Hasil inkubasi campuran bakteri pada suhu dingin dan larutan *cracking* kemudian disentrifugasi pada suhu 4 °C pada kecepatan 12.000 rpm selama lima menit. Larutan supernatan yang terpisah dari pelet bakteri digunakan untuk elektroforesis. Elektroforesis menggunakan agarosa 0,7%. Campuran serbuk agarosa dan ethidium bromida dalam erlenmeyer dipanaskan pada oven hingga larut dan homogen. Larutan agarose didinginkan selama 15 menit pada suhu ruang, lalu dituangkan dalam cetakan sumur dan didiamkan kembali hingga dingin dan mengeras sebelum digunakan.

Setiap supernatan dari hasil *colony cracking* diambil sebanyak 5 μ L menggunakan pipet mikro, dimasukkan dalam sumur mulai dari sumur kedua. Selanjutnya *marker* (penanda) dimasukkan pada sumur pertama sebanyak 3 μ L. Sampel dielektroforesis selama sekitar 45 menit dengan tegangan 200 Volt dan kuat arus 70 Ampere. Arus listrik pada alat elektroforesis dimatikan setelah *bromophenol blue* telah bergerak hingga $\frac{3}{4}$ panjang agarosa. Agarosa kemudian diangkat dari bak elektroforesis dan dimasukkan ke dalam *ultraviolet illuminator* untuk pengambilan gambar hasil deteksi plasmid GP25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolasi bakteri dan uji sensitivitasnya terhadap ampisilin

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengisolasi bakteri yang terdapat pada air kolam budidaya ikan mas (Tabel 1). Isolasi bakteri

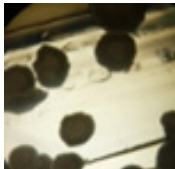
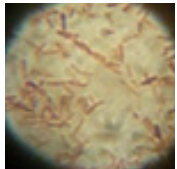
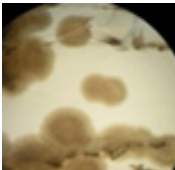
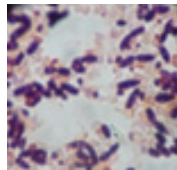
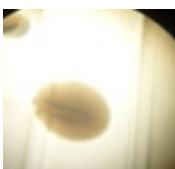
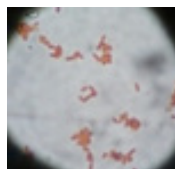

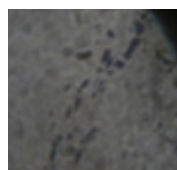
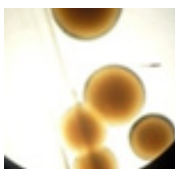

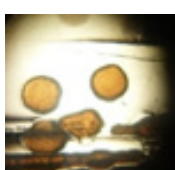
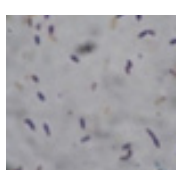
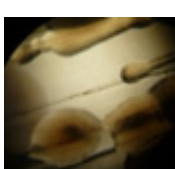
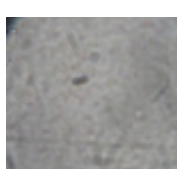
yang dominan ditandai dengan jumlah koloni yang dihasilkan cukup banyak. Isolat bakteri dimurnikan sebelum diidentifikasi lebih lanjut.

Terdapat tujuh isolat bakteri yang diisolasi dari kolam budidaya ikan mas (Tabel 1). Bakteri yang dipilih merupakan bakteri yang memiliki morfologi koloni yang berbeda pada media agar LB-Tripton. Selanjutnya isolat bakteri dimurnikan pada media agar LB-Tripton dan lihat cirinya dengan uji Gram. Hasil isolasi kemudian

di uji sensitivitasnya terhadap ampisilin terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai bakteri perlakuan dalam penelitian (Tabel 2). Bakteri yang digunakan merupakan isolat bakteri yang sensitif terhadap ampisilin (Gambar 1).

Berdasarkan Tabel 2 didapatkan lima isolat bakteri yang sensitif terhadap ampisilin. Isolat bakteri asal air kolam budidaya yang sensitif terhadap ampisilin ditunjukkan dengan tidak tumbuhnya isolat bakteri ketika digoreskan pada

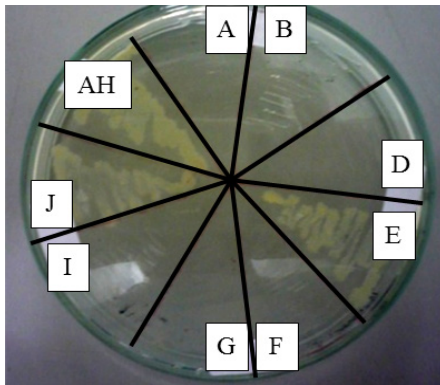
Tabel 1. Hasil karakteristik awal bakteri air kolam budidaya ikan mas

Isolat	Gram	Warna bakteri	Bentuk bakteri	Bentuk koloni (Perbesaran 10×10)	Sel bakteri (Pewarnaan Gram; Perbesaran 100×10)
A	negatif	putih susu	basil (batang)		
B	positif	putih	basil (batang)		
D	negatif	orange	basil (batang)		
E	positif	putih bening	basil (batang)		
G	negatif	kuning	kokus (bulat)		
I	positif	putih susu	basil (batang)		
J	negatif	putih bening	kokus (bulat)		

media agar LB-Trypton yang ditambahkan dengan ampisilin. Hasil menunjukkan isolat bakteri yang dapat digunakan adalah isolat bakteri dengan label A, B, D, G, dan I, sedangkan *A. hydrophila*, isolat bakteri E dan J merupakan isolat bakteri yang resisten terhadap ampisilin. Uji sensitivitas dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Deteksi plasmid GP25 pada isolat bakteri

Setelah inkubasi dan pembiakan bakteri di media yang mengandung ampisilin, terjadi



Gambar 1. Hasil uji sensitivitas *Aeromonas hydrophila* (AH) dan isolat bakteri air kolam budidaya ikan mas terhadap ampisilin pada media agar LB-Trypton yang ditambahkan dengan ampisilin.

Tabel 2. Uji sensitivitas *Aeromonas hydrophila* dan isolat bakteri air kolam budidaya ikan mas terhadap ampisilin

Isolat	Sensitivitas ampisilin
<i>A. hydrophila</i>	resistan
A	sensitif
B	sensitif
D	sensitif
E	resistan
G	sensitif
I	sensitif
J	resistan

pertumbuhan bakteri isolat B pada kelompok inkubasi 30 menit dan isolat D pada kelompok 180 menit (Tabel 3). Pertumbuhan koloni bakteri terlalu banyak untuk dihitung jumlah (TBUD) (Gambar 2). Kontrol positif yang digunakan adalah bakteri *Bacillus* sp. yang memiliki sifat transformasi alami dan memiliki sifat resisten terhadap antibiotik ampisilin (Gambar 3).

Cracking sel isolat bakteri

Cracking atau pemecahan sel isolat bakteri B dan D yang tumbuh pada perlakuan penambahan vaksin GP25 LB-Trypton telah ditambahkan ampisilin. *Cracking* sel menunjukkan adanya plasmid GP25 dalam bakteri kontrol, tetapi tidak dalam isolat bakteri (Gambar 4).

Berdasarkan elektroforesis hasil *cracking* tidak ditemukannya pita vaksin GP25 pada isolat bakteri yang tumbuh pada media yang ditambahkan dengan antibiotik. Kontrol positif pada metode *colony cracking* menggunakan bakteri pembawa vaksin GP25 dengan tiga sampel yang ditunjukkan dengan tanda panah berwarna hijau, menunjukkan adanya plasmid GP25.

Pembahasan

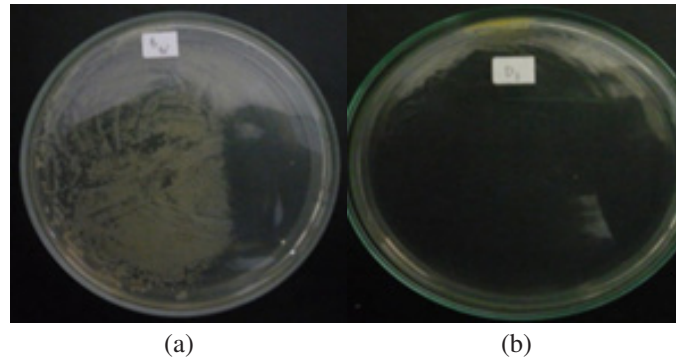
KHV atau yang dikenal dengan nama *cyprinid herpes virus 3* atau CyHV-3 merupakan virus yang diklasifikasikan sebagai virus DNA pada keluarga *Herpes viridae* (Waltzek *et al.*, 2005). KHV telah didiagnosis pada ikan koi dan ikan mas dan penularan KHV mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi (McCleary *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2014).

KHV bersifat sangat menular yang menyerang semua stadia ikan mas dan koi. Penyerangan virus KHV yang tinggi memerlukan berbagai metode untuk menanggulangi penyebaran dan mortalitas KHV, salah satunya dengan menggunakan vaksin DNA. Vaksin DNA efektif digunakan untuk mencegah dengan meningkatkan kekebalan

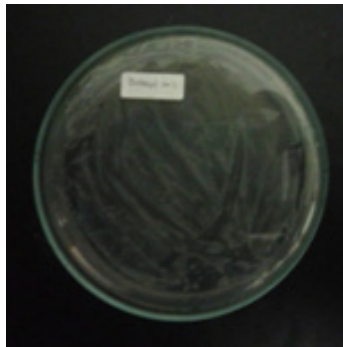
Tabel 3. Pertumbuhan isolat bakteri pada media mengandung ampisilin setelah penambahan vaksin DNA GP25

Inkubasi (menit)	Isolat bakteri							
	A	B	D	G	I	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kontrol +	Kontrol -
30	-	TBUD	-	-	-	TBUD	TBUD	TBUD
60	-	-	-	-	-	TBUD	TBUD	TBUD
180	-	-	TBUD	-	-	TBUD	TBUD	TBUD
300	-	-	-	-	-	TBUD	TBUD	TBUD

Keterangan: TBUD = terlalu banyak untuk dihitung.



Gambar 2. Pertumbuhan isolat bakteri setelah penambahan vaksin GP25 pada media LB Trypton yang mengandung ampisilin. Inkubasi selama 30 menit pada isolat bakteri B (1) dan 180 menit pada isolat bakteri D (2).



Gambar 3. Pertumbuhan kontrol positif *Bacillus* sp. setelah penambahan vaksin GP25 pada media LB Trypton yang mengandung ampisilin dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 28 °C.

spesifik pada ikan. Menurut Nuryati *et al.* (2010b) pemberian vaksin dapat merangsang kekebalan spesifik dan kekebalan yang timbul relatif tinggi.

Pada metode perendaman keterbatasan yang terjadi bukan hanya tidak diketahuinya banyak antigen yang dapat diserap oleh ikan, tetapi juga keamanan penggunaan vaksin DNA pada lingkungan budidaya ikan mas saat proses perendaman. Vaksin DNA diuji pada mikroorganisme berupa bakteri yang terdapat pada perairan kolam budidaya ikan mas untuk mengetahui adanya efek tersebut. Penelitian ini menggunakan plasmid yang mengandung gen imunogenetik GP25 yang telah diuji aktivitasnya.

Kegiatan penelitian ini menggunakan sampel bakteri yang diisolasi dari kolam budidaya ikan mas. Bakteri asal kolam diisolasi dan dimurnikan hingga didapatkan koloni tunggal bakteri yang akan digunakan sebagai bakteri uji sensitivitas terhadap antibiotik ampisilin. Selain bakteri asal kolam budidaya, digunakan juga bakteri *Aeromonas hydrophilla* sebagai salah satu bakteri yang diuji karena bakteri ini biasa ditemukan di perairan budidaya. *Bacillus* sp. digunakan sebagai kontrol positif karena memiliki mekanisme transformasi secara alamiah dan bersifat

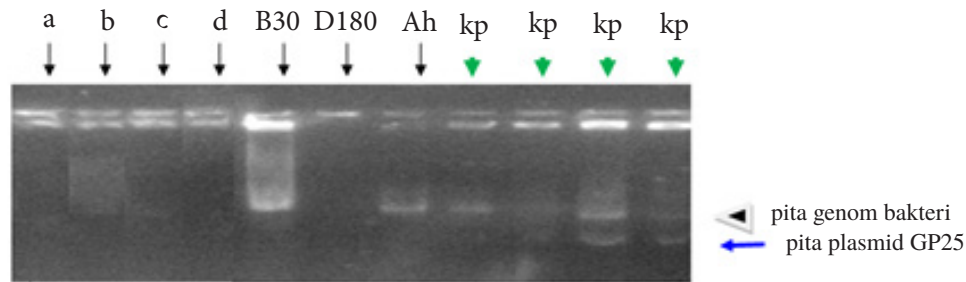
kompeten secara alamiah (Johnston *et al.*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa *Bacillus* sp. memiliki sifat untuk mengambil plasmid secara alami dari bakteri lain atau dari lingkungannya.

Dosis yang digunakan berasal dari perhitungan untuk ikan berukuran 10–15 g yang mampu mengekspresikan vaksin DNA pada jaringan insang, ginjal, limpa, dan otot dengan dosis 12,5 µg/ 100 µL melalui injeksi (Nuryati *et al.*, 2010a). Penggunaan media LB-Trypton karena media tersebut menghasilkan banyak koloni dan bernilai ekonomis (Danquah & Forde, 2007).

Vaksin GP25 merupakan plasmid yang berasal dari bakteri *E. coli* DH5-α terkonstruksi yang ditumbuhkan pada media mengandung ampisilin. Dalam plasmid GP25 terdapat gen yang resisten terhadap ampisilin. Penambahan ampisilin pada media LB-Trypton untuk media penumbuhan bakteri yang diuji pada penambahan vaksin bertujuan mengamati adanya gen pembawa plasmid yang mengandung penanda resistensi terhadap ampisilin dalam tubuh bakteri.

Berdasarkan hasil pertumbuhan bakteri pada media agar LB-Trypton yang mengandung ampisilin pada media 1 mL air steril menunjukkan adanya pertumbuhan pada sampel bakteri B pada inkubasi 30 menit dan sampel bakteri D pada inkubasi 180 menit. Hasil yang didapatkan menunjukkan indikasi bahwa bakteri tersebut dapat meng-*uptake* plasmid yang dicampurkan dalam media uji. Uji lanjut dilakukan untuk membuktikan adanya plasmid dalam sel bakteri tersebut dengan metode *colony cracking*.

Hasil *colony cracking* menunjukkan tidak terdapat bakteri, termasuk bakteri B dan D, yang mengandung vaksin. Hasil juga menunjukkan bahwa *Bacillus* yang memiliki sifat *natural transformation* tidak dapat mengambil atau *uptake* plasmid yang diberikan selama prosedur uji penambahan vaksin GP25 inkubasi 30, 60, 180, dan 300 menit. Hasil yang didapatkan



Gambar 4. Elektroforesis hasil cracking isolat bakteri *Bacillus* sp. (kontrol negatif) inkubasi 30 (a), 60 (b), 180 (c), 300 (d), sampel B inkubasi 30 menit (B30), isolat bakteri D inkubasi 180 menit (D180), *Aeromonas hydrophila* (Ah) dan bakteri pembawa GP25 sebagai kontrol positif (kp).

menggunakan bakteri pembawa vaksin GP25 sebagai kontrol positif. Nilai negatif dibuktikan dengan tidak terdeteksi gen GP25 pada sampel bakteri setelah *cracking* dan dielektroforesis hasil tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya pita yang sejajar dengan kontrol positif. Pada penelitian ini diketahui bahwa isolat B, D, dan bakteri *Bacillus* mengalami mutasi titik, sehingga meskipun pada bakteri tidak ditambahkan GP25, isolat tersebut dapat tumbuh pada media ampisilin. Hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 3 yang menyebutkan bahwa isolat B (inkubasi selama 30 menit) dan isolat D (inkubasi selama 180 menit), dan kontrol negatif dapat tumbuh dalam media berampisilin, sedangkan pada uji *cracking* hasilnya negatif (Gambar 4).

Pertumbuhan bakteri pada media yang ditambahkan dengan antibiotik ampisilin dapat disebabkan meningkatnya resistensi bakteri sampel terhadap antibiotik yang digunakan. Resistensi bakteri terhadap antibiotik sendiri merupakan kemampuan alami bakteri untuk mempertahankan diri terhadap antibiotik untuk melanjutkan hidup dalam media yang terdapat antibiotik (Le *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Menurut Hermsen *et al.* (2012) salah satu penyebab terjadinya resistensi adalah evolusi vertikal atau mutasi dan seleksi. Evolusi vertikal didorong oleh prinsip seleksi alam. Mutasi spontan pada kromosom bakteri dapat menimbulkan resistensi pada suatu populasi bakteri. Bakteri yang bermutasi akan mengalami sifat resisten dan kemudian dapat tumbuh dan berkembang biak.

KESIMPULAN

Hasil pencampuran vaksin DNA GP25 dengan bakteri flora normal isolat asal kolam budidaya ikan mas melalui metode ini tidak menunjukkan adanya potensi transmisi dari plasmid GP25 terhadap bakteri flora normal yang ditunjukkan

dengan tidak terdapatnya plasmid pembawa gen GP25 dalam sel bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Cho MY, Won KM, Kim JW, Jee BY, Park MA, Hong S. 2014. Detection of koi herpesvirus (KHV) in healthy cyprinid seed stock. *Diseases of Aquatic Organism* 112: 29–36.
- Danquah MK, Forde GM. 2007. Growth medium selection and its economic impact on plasmid DNA production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104: 490–497.
- Hedrick RP, Giland, Yun O, Macdowell S, Waltzek TS, Kelley TB, Adkison GOMA. 2005. Initial isolation and characterization of herpes-like virus (KHV) from koi and common carp. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 2: 1–7.
- Hermsen R, Deris JB, Hwa T. 2012. On the rapidity of antibiotic resistance evolution facilitated by a concentration gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 10.775–10.780.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms, and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12: 181–196.
- Le TX, Munekage Y, Kato SI. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of the Total Environment* 349: 95–105.
- Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467: 82–85.
- Lorenzen N, Lapatra. 2005. DNA vaccine for aquaculture fish. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties* 24: 201–213.
- McCleary S, Ruan NM, Cheslett D, Hickey C, Rodger HD, Geoghegan F, Henshilwood K.

2012. Detection of koi herpesvirus (KHV) in koi carp *Cyprinus carpio* L. imported into Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 31: 1–9.
- Nuryati S, Alimuddin, Sukenda, Damayanti R, Santika A, Pasaribu F, Sumantadinata K. 2010a. Construction of a DNA vaccine using glycoprotein gene and its expression toward increasing survival rate of KHV-infected common carp *Cyprinus carpio*. Nature Indonesia 13: 47–52.
- Nuryati S, Maswan NA, Alimuddin, Sukenda, Sumantadinata K, Pasaribu FH, Soejoedono RD, Santika A. 2010b. Hematology of common carp following DNA vaccination and koi herpesvirus challenge test. Jurnal Akuakultur Indonesia 9: 9–15.
- Pokorova D, Vesely T, Piackova V, Hulova J. 2005. Current knowledge on koi herpes virus (KHV): a review. Veterinary Medicine (Praha) 50: 139–47.
- Sunarto A, Rukyani A, Itami T. 2005. Indonesian experience on the outbreak of koi herpes virus in koi and carp *Cyprinus carpio*. Bulletin of Fisheries Research Agency 86: 15–21.
- Waltzek, Thomas B, Kelley GO, Stone DM, Way K, Hanson L, Fukuda H, Hirono I, Aoki T, Davison AJ, Hedrick RP. 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. Journal of General Virology 86: 1.659–1.667.
- Weber III, Scott EP, Malm KV, Yun SC, Campbell LA, Kass PH, Marty GD, Saloni K, Dishon A. 2014. Efficacy and safety of a modified-live cyprinid herpesvirus 3 vaccine in koi *Cyprinus carpio* koi for prevention of koi herpesvirus disease. American Journal of Veterinary Research 75: 899–904.
- Xu JR, Bently J, Beck L, Reed A, Miller-Morgan T, Heidel JR, Kent ML, Rockey DD, Jin L. 2013. Analysis of koi herpesvirus latency in wild common carp and ornamental koi in Oregon, USA. Journal of virological methods, 187: 372–379.