

ISOLASI DNA GENOMIK *Vibrio alginolyticus* UNTUK PEMBUATAN VAKSIN REKOMBINAN

Evy Maftuti Nur dan Zariah

Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara

ABSTRAK

Usaha perikanan kerapu di beberapa daerah telah banyak berkembang, tetapi masih banyak kendala antara lain kematian yang tinggi yang disebabkan oleh penyakit vibriosis. Pengobatan dengan menggunakan obat-obatan dan bahan kimia sangat tidak dianjurkan karena akan menimbulkan efek samping terhadap lingkungan dan manusia. Alternatif pengendalian yaitu dengan menggunakan vaksin yang bertujuan untuk meminimalkan insiden penyakit yang mematikan. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk menghasilkan DNA genomik *Vibrio alginolyticus* sebagai bahan pembuat vaksin. Metode yang digunakan meliputi: isolasi bakteri *Vibrio alginolyticus*, ekstraksi DNA genomik *Vibrio alginolyticus* dengan menggunakan metode fenol dan pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280. Dari hasil kegiatan didapatkan kadar DNA genomik *Vibrio alginolyticus* isolat Jepara rata-rata 2.545 ng/ μ L dengan rasio A260/A280 sebesar 1,0 sedangkan kadar DNA genomik isolat ATCC rata-rata 3685 ng/ μ L dengan rasio A260/A280 sebesar 1,1.

KATA KUNCI: vaksin rekombinan, *Vibrio alginolyticus*, DNA

PENDAHULUAN

Ikan kerapu merupakan salah satu komoditas perikanan yang memiliki nilai ekonomis penting terutama dalam keadaan hidup, dan Indonesia merupakan salah satu pemasok utama ikan kerapu hidup ke Hongkong. Permintaan ikan ini terus meningkat baik di pasaran dalam negeri maupun luar negeri sehingga dapat menjadi penghasil devisa dari sektor perikanan.

Untuk memenuhi permintaan tersebut telah banyak berkembang usaha perikanan kerapu di Bali, Situbondo, dan Lampung. Tetapi dalam kenyataannya masih dihadapkan pada kendala utama yaitu tingkat mortalitas tinggi yang disebabkan oleh adanya infeksi bakteri patogen atau lebih sering disebut penyakit vibriosis.

Penyakit vibriosis pada ikan kerapu tidak hanya menjadi masalah di Indonesia saja tetapi juga di Asia Tenggara (Nitimulya *et al.*, 2005). Penyakit vibriosis yang paling banyak diisolasi dari ikan kerapu yang sakit adalah dari spesies *Vibrio alginolyticus* yang merupakan patogen oportunist dengan tingkat keganasan sedang sampai tinggi (Desrina *et al.*, 2006).

Pengendalian dengan obat-obatan dan bahan kimia sangat tidak dianjurkan karena akan menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan yang akhirnya akan berpengaruh ke manusia. Apalagi di era perdagangan bebas sekarang ini, semua produk perikanan harus dilengkapi dengan *ecolabeling* dan harus bersih (*clean production*) dari segala residu antibiotik dan pestisida (Taslihan & Kontara, 2001). Alternatif pengendalian vibriosis pada ikan kerapu adalah dengan cara vaksinasi yang bertujuan untuk meminimalkan insiden penyakit ini.

TUJUAN

Untuk mengisolasi DNA genomik *Vibrio alginolyticus* sebagai bahan untuk pembuatan vaksin rekombinan.

BAHAN DAN TATA CARA

Bahan dan alat yang digunakan adalah:

- Nutrien broth, Isolat bakteri *Vibrio alginolyticus*, Bahan ekstraksi DNA
- Tabung konikel, Inkubator, Sentrifuse, Ruang asam, Spektrofotometer, dan Mikropipet

Adapun isolat DNA-nya melalui tahapan sebagai berikut:

♦ **Isolasi bakteri *Vibrio alginolyticus***

- Isolat bakteri *Vibrio alginolyticus* direinfeksi ke ikan kerapu sehat sebanyak 3 kali untuk meningkatkan virulensinya.
- Isolat bakteri di kultur dalam media nutrisi broth, di inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C.
- Bakteri dipanen dengan cara di sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C, kemudian supernatan dibuang. Hasil berupa pelet bakteri untuk dibuat ekstraksinya.

♦ **Ekstraksi DNA bakteri menggunakan metode fenol (Sambrook, 1989)**

- Pelet bakteri dihancurkan menggunakan pestel dengan ditambah 300 µL akuades, 30 µL proteinase-K, 30 µL RNase, dan 30 µL SDS.
- Di inkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit.
- Ditambahkan fenol sebanyak 400 µL, dikocok dengan keras dan di sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- Supernatan dipindah ke dalam ke tabung baru, ditambahkan fenol sebanyak 400 µL, dikocok dengan keras dan di sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- Supernatan baru ini dipindah ke dalam ke tabung baru, ditambahkan CIAA sebanyak 400 µL, dikocok dengan keras dan di sentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- Supernatan diambil sebanyak 300 µL ke tabung baru, ditambah 30 µL sodium acetat dan 750 µL ethanol absolut. Dikocok dengan baik kemudian disimpan pada suhu -20°C selama 15 menit.
- Disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang.
- Supernatan dibuang, ekstrak dicuci dengan alkohol 70% sebanyak 1.500 µL, dikocok dengan baik.
- Disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- Supernatan dibuang, ekstrak DNA dicuci lagi dengan ethanol absolut sebanyak 1.200 µL, dikocok dengan baik.

- Disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- Supernatan dibuang lagi dan ekstrak DNA dikeringkan dalam inkubator/desikator selama 10 menit.
- Dilarutkan dengan akuabides sebanyak 50-200 µL, dan DNA siap digunakan.

♦ **Pengukuran konsentrasi DNA**

- DNA hasil ekstraksi diukur absorbansinya (OD = *Optical Density*) menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280.
- Kadar DNA dihitung menggunakan rumus :
Kadar DNA = Nilai OD x faktor pengenceran x 50
Untuk kadar DNA penghitungan dikalikan dengan 50.
- Kemurnian DNA dapat diketahui dengan rumus Rasio A260/A280 :
 - Bila hasilnya bernilai diantara 1,8-2,0 berarti DNA murni
 - Bila kurang dari 1,8 berarti ada kontaminasi protein
 - Bila lebih dari 2,0 berarti ada kontaminasi RNA

HASIL DAN BAHASAN

Kadar DNA genomik *Vibrio alginolyticus* isolat Jepara yang ada saat ini rata-rata 2.545 ng/µL dengan rasio A260/A280 sebesar 1,0 sedangkan kadar DNA genomik *Vibrio alginolyticus* dari isolat ATCC (American Type Culture Collection) rata-rata 3.685 ng/µL dengan rasio sebesar 1,1. Jika dibandingkan dengan kadar DNA *Vibrio alginolyticus* isolat Jepara maupun *Vibrio alginolyticus* isolat ATCC isolat DNA percobaan ini tergolong masih bagus karena kadarnya masih tinggi tetapi jika dilihat dari rasio A260/A280 masih jauh dari yang dipersyaratkan yaitu 1,8-2. Diduga bahwa isolat DNA masih mengandung protein, dan dikhawatirkan mengganggu reaksi misalnya enzimatis. Pemurnian masih perlu dilakukan untuk tujuan tertentu sehingga DNA yang dihasilkan tidak tercampur protein, salah satu cara adalah dengan mengulangi prosedur fenol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kadar DNA genomik yang dihasilkan digunakan dari isolat bakteri dalam penelitian ini masih belum memenuhi standar dalam kemurniannya.

Tabel 1. Hasil pengukuran nilai absorpsi DNA hasil ekstraksi

Kode	Ulangan	A 260	A 280	Rasio 260/280
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	1	0,458	0,449	1,0212
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	2	0,464	0,452	1,0273
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	3	0,441	0,438	1,0061
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	4	0,442	0,439	1,0004
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	5	0,614	0,581	1,0582
<i>V. algiolyticus</i> isolat Jepara	6	0,637	0,592	1,0763
Rerata		0,509	0,492	1,0316
<i>V. algiolyticus</i> isolat ATCC	1	0,774	0,659	1,1744
<i>V. algiolyticus</i> isolat ATCC	2	0,691	0,618	1,1194
<i>V. algiolyticus</i> isolat ATCC	3	0,746	0,644	1,1586
Rerata		0,737	0,64	1,1508

Perlu dilakukan uji lanjutan untuk menghasilkan DNA genomik murni dengan nilai rasio 1,8-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bpk. Ir. Sudjiharno, Kepala BBPBAP Jepara, Bpk. Ir. Zaenal Arifin, M.Sc., koordinator lab. Keskanling, Ibu drh. Retna Handayani, M.Si., dan Ibu Sri Murti Astuti, S.P. penyelia lab. Biomol dan penyeliaan lab. Mikrobiologi serta teman-teman di lab. Keskanling atas dukungan dan bimbingan yang diberikan dalam penulisan makalah ini.

DAFTAR ACUAN

- Desrina, A., Taslihan, Ambariyanto, & Suryaningrum, S. 2006. Uji keganasan bakteri vibrio pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Ilmu Kelautan 11. hlm. 119-125
- Nitimulyo, K.H., Isnansetya, A., Triyanto, Istiqomah, I. & Murdjani, M. 2005. Isolasi, identifikasi, dan karakterisasi *Vibrio* spp. Patogen penyebab vibriosis pada kerapu di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan VII*, 2: 80-94.
- Sambrook, J., Mariatis, T., & Fritsch, E.F. 1989. Molekuler cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold spring harbour laboratory. Cold Spring Harbour. New York. p. 6.3, 6.9, 6.15, 6.36, 6.44.
- Taslihan, A. & Kontara, E.K. 2001. Sistem pengendalian hama dan penyakit ikan pada budidaya tambak air payau dalam mengantisipasi persyaratan negara-negara pengimpor. Paper disampaikan pada pertemuan pembahasan kebijakan pengelolaan kesehatan ikan dalam memenuhi persyaratan negara-negara pengimpor dan penanggulangan wabah hama dan penyakit ikan di Cisarua. Bogor, 2-4 Desember 2001. 15 hlm.