

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

IDENTIFIKASI IKAN CUPANG (*Betta imbellis*) TRANSGENIK *FOUNDER* MEMBAWA GEN PENYANDI HORMON PERTUMBUHAN

Eni Kusri¹⁾, Alimuddin²⁾, Muhammad Zairin Jr.²⁾, dan Dinar Tri Sulistyowati²⁾

¹⁾ Program Pascasarjana Ilmu Akuakultur, Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor
Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias

²⁾ Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi keberhasilan introduksi gen penyandi hormon pertumbuhan (*Growth Hormone*, GH) pada induk F-0 ikan *Betta imbellis*. Ikan transgenik F-0 dibuat dengan menggunakan metode transfeksi. Identifikasi dilakukan menggunakan metode RT-PCR. RNA total diekstraksi dari embrio *pooled sample* hasil persilangan induk transgenik dan non-transgenik. Berdasarkan analisis ekspresi gen pada embrio juga menunjukkan adanya aktivitas ekspresi gen GH pada semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol (embrio hasil persilangan non-transgenik x non-transgenik). Jumlah individu induk F-0 yang membawa gen GH eksogen berdasarkan analisis PCR dengan DNA *template* dari sirip ekor adalah sebanyak 16%. Individu positif membawa gen GH eksogen tersebut dibesarkan lebih lanjut untuk memproduksi *Betta imbellis* transgenik F-1. Kandidat ikan transgenik jantan F-0 dikawinkan dengan ikan non-transgenik betina, sedangkan transgenik F-0 betina dikawinkan dengan non-transgenik jantan. Sebanyak 30-50 butir embrio hasil pemijahan F-0 digabung, kemudian DNA genom diekstrak. Sebagian embrio digunakan untuk ekstraksi RNA total untuk analisis ekspresi mRNA GH eksogen. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa semua sampel embrio dari induk transgenik F-0 dapat terdeteksi gen GH eksogen, sedangkan untuk kontrol (non-transgenik) tidak terdeteksi. Ekspresi mRNA juga terdeteksi pada embrio F-1. Dengan demikian, metode transfeksi embrio *Betta imbellis* efektif digunakan untuk menghasilkan ikan transgenik, dan sangat berpotensi menghasilkan individu F-1 *Betta imbellis* dengan pertumbuhan lebih cepat.

KATA KUNCI: *Betta imbellis*; hormon pertumbuhan; identifikasi induk F-0

ABSTRACT: *Identification of transgenic founder betta fish (Betta imbellis) carried growth hormone gene. By: Eni Kusri, Alimuddin, Muhammad Zairin Jr., and Dinar Tri Sulistyowati*

*The study was conducted to identify the successful introduction of the growth hormone gene (Growth Hormone, GH) on the F-0 **Betta imbellis** broodstock. The F-0 transgenic fish was made through transfection methods. Identification was done using RT-PCR method. Total RNA was extracted from pooled embryos sample. Based on the analysis of gene expression in embryos also showed activity GH gene expression in all treatments compared to the control (non-transgenic x non-transgenic). The number of individuals F-0 which carried exogenous GH gene by PCR analysis of the DNA template of the tail fin was as much as 16%. Positive individuals carried the exogenous GH gene raised further to produce transgenic F-1 **B. imbellis**. Candidate of transgenic F-0 males fish were mated with non-transgenic female fish, whereas the transgenic F-0 females were mated with non-transgenic males. The 30-50 embryos obtained were combined, then their genomic DNA were extracted. Some of the embryos was used for the extraction of total RNA for analysis of mRNA expression of GH exogenous. The PCR analysis showed that all samples of embryos from the transgenic F-0 broodstock could be detected, whereas for the control (non-transgenic) was not detected. mRNA expression was also detected in embryos of F-1. The average weight of the F-0 broodstocks were 1.55 g and a total length was 12.97 cm. Thus, the transfection methods through betta embryos peaceful effectively generated transgenic fish, and potentially produced fast growth of individuals F-1 **Betta imbellis**.*

KEYWORDS: *Betta imbellis*; growth hormone; verification of F-0 broodstock

Korespondensi: Program Pascasarjana Ilmu Akuakultur,
Departemen Budidaya Perairan, FPIK, IPB. Jl. Rasamala, Kampus
IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia. Tel.: + (0251) 8627076
E-mail: ennyperikanan@yahoo.com

PENDAHULUAN

Pada ikan dan vertebrata lainnya, pertumbuhan dikontrol antara lain oleh keberadaan hormon pertumbuhan. Transfer gen *growth hormone* (GH) telah diaplikasikan pada beberapa spesies ikan budidaya dan terbukti mampu meningkatkan pertumbuhannya. Keberhasilan penelitian transfer gen telah dilakukan terhadap ikan-ikan konsumsi dengan menggunakan gen hormon pertumbuhan di antaranya adalah ikan salmon transgenik dengan menggunakan promoter *methallothionein* dan gen penyandi hormon pertumbuhan yang diisolasi dari ikan salmon, ikan nila transgenik menggunakan promoter β -aktin medaka dan gen GH dari ikan nila (Yaskowiak *et al.*, 2006), serta ikan mud loach transgenik menggunakan promoter β -aktin dan GH dari ikan mud loach (Nam *et al.*, 2001).

Hormon pertumbuhan merupakan bagian dari hormon yang disirkulasikan untuk menstimulasi pertumbuhan tubuh. Pada awal produksi ikan transgenik digunakan gen GH dari manusia atau tikus yang disambungkan dengan promoter metalotionein-1 dari tikus (Maclean *et al.*, 1987). Pada saat ini berkembang produksi ikan transgenik dengan menggunakan gen GH yang berasal dari ikan (Du *et al.*, 1992). Hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa ikan mas, ikan salmon, northern pike, ikan loach, ikan trout, dan ikan lele dapat ditransformasi dengan berbagai hormon pertumbuhan dengan promoter yang berbeda untuk memproduksi ikan dengan peningkatan pertumbuhan lebih dari 100% dibandingkan kontrol (Hackett, 1993). Gen GH merupakan salah satu gen target yang paling banyak digunakan dalam transgenik ikan. Transfer gen GH telah diaplikasikan pada ikan salmon sehingga dapat tumbuh lebih cepat dari ikan normal (Devlin *et al.*, 1994), ikan mud loach dengan kecepatan tumbuh 32 kali lebih cepat (Nam *et al.*, 2001), dan ikan nila dengan pertumbuhan 2-7 kali lebih cepat (Kobayashi *et al.*, 2007).

Peningkatan laju pertumbuhan ikan merupakan salah satu motivasi awal pada rekayasa genetika ikan yang didasarkan pada penelitian bahwa tikus secara signifikan dapat ditingkatkan setelah diintroduksi gen hormon pertumbuhan tikus tanah (sekuen heterolog) yang disambungkan dengan promoter *metallothionein* (MT) tikus ke dalam genom tikus (Palmiter *et al.*, 1982). Berdasarkan penelitian ini maka diperoleh petunjuk untuk keberhasilan produksi ikan transgenik dengan pertumbuhan yang cepat, yaitu regulator transgen dari spesies yang kekerabatannya jauh kemungkinan tidak dikenali oleh RNA gen asing. Namun demikian, hasil observasi selanjutnya

menunjukkan bahwa transgenik GH yang berasal dari spesies yang kekerabatannya dekat efektif meningkatkan pertumbuhan hewan inang, tetapi apabila menggunakan sekuens gen GH homolog dengan promoternya yang sama dari spesies yang sama kemungkinan tidak terlalu efektif karena adanya potensi pengaturan umpan balik negatif (Nam *et al.*, 2008).

Tingkat ekspresi transgen pada organisme transgenik yang stabil dipengaruhi oleh banyak faktor, terutama promoter yang mengendalikan transgen, jumlah kopi transgen dalam genom, dan interaksi antara transgen dan sekuens yang mengapit transgen (Rahman *et al.*, 2000). Selanjutnya dikatakan oleh Rahman *et al.* (2000) yang mengintroduksi gen reporter *lacZ* dengan promoter β -aktin ikan mas pada ikan nila menunjukkan adanya pola *mosaic* dari ekspresi *lacZ* pada jaringan somatik berbeda antar garis keturunan, tetapi konsisten dalam satu garis keturunan. Analisis ekspresi gen reporter pada jaringan yang didasarkan pada ekspresi gen *lacZ* pada ikan transgenik stabil menunjukkan intensitas yang bervariasi pada organ dan jaringan yang berbeda dan kadang-kadang bervariasi pada sel-sel yang berbeda dalam jaringan yang sama pada generasi transgenik pertama dan kedua.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya untuk introduksi gen GH terhadap *Betta imbellis* menggunakan metode transfeksi efektif pada individu F-0 dan didapatkan sebesar 16% (Kusriani *et al.*, 2014). Pada penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi terhadap induk-induk F-0 yang merupakan *germline transmitter*. Keberadaan gen GH eksogen pada embrio dari pemijahan ikan F-0 dengan non-transgenik dianalisis menggunakan metode PCR, dan ekspresi mRNA diuji menggunakan metode RT-PCR untuk mengevaluasi potensi dihasilkannya ikan betta cepat tumbuh. Ikan betta cepat tumbuh sedang menjadi tren pasar yang dikenal dengan betta giant. Betta giant memiliki ukuran yang lebih besar (> 7 cm) dari ukuran betta normal (3-4 cm ukuran normal *B. imbellis*). Upaya untuk memproduksi betta giant selain melalui seleksi dapat juga melalui aplikasi transgenesis. Metode transgenesis dengan mengintroduksi gen GH ke embrio telah berhasil dilakukan, dan telah didapatkan individu F-0. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap induk-induk F-0 yang merupakan *germline transmitter*. Keberadaan gen GH eksogen pada embrio dari pemijahan ikan F-0 dengan non-transgenik dianalisis menggunakan metode PCR, dan ekspresi mRNA diuji menggunakan metode RT-PCR untuk mengevaluasi potensi dihasilkannya ikan betta cepat tumbuh.

BAHAN DAN METODE

Pemeliharaan Calon Induk dan Pemijahan Ikan Transgenik F-0

Calon induk ikan transgenik F-0 yang membawa gen GH eksogen pada sirip dipelihara sampai mencapai umur 7-9 bulan (matang gonad). Pakan yang diberikan untuk pembesaran dan pematangan gonad induk-induk F-0 berupa *bloodworm* (larva chironomus beku) dan *tubifex* yang diberikan secara berseling sehari dan secara *ad libitum*.

Pemijahan berpasangan 1:1 dilakukan secara alami di dalam wadah berupa baskom. Induk yang digunakan masing-masing berjumlah tiga ekor dengan jantan rata-rata panjang $5,48 \pm 0,13$ cm dan bobot $2,56 \pm 0,23$ g; sedangkan betina rata-rata panjang $4,98 \pm 0,33$ cm dan bobot $2,44 \pm 0,60$ g. Persilangan dilakukan secara resiprokal yaitu menggunakan induk transgenik dengan induk non-transgenik masing-masing dengan tiga ulangan induk yang berbeda. Perlakuan A (induk jantan transgenik x betina transgenik); perlakuan B (induk jantan transgenik x betina non-transgenik); perlakuan C (induk jantan non-transgenik x betina transgenik); dan perlakuan D (induk jantan non-transgenik x betina non-transgenik). Pengambilan sampel berupa embrio hasil pemijahan masing-masing pasangan induk secara *pooled sample* (50 butir).

Analisis DNA Genom

DNA genom diekstraksi dari 50 sampel (butir telur) untuk uji konfirmasi masuknya gen hormon pertumbuhan ke embrio dan larva *B. imbellis*. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* sesuai prosedur manual. DNA hasil ekstraksi dilarutkan menggunakan $100 \mu\text{L}$ *elution buffer*, dan disimpan dalam *freezer* hingga akan digunakan dalam proses PCR.

Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan *maxima hot start green PCR master mix 2x* (Thermo science). Komposisi reaksi PCR adalah $12,5 \mu\text{L}$ master mix, $1 \mu\text{L}$ primer *PhGH* dengan konsentrasi 20 pmol (F3*PhGH*: 5'-TCT TTA GTC AAG GCG CGA CAT TCG AGA-3', dan R3*PhGH*: 5'-CGA TAA GCA CGC CGA TGC CCA TTT TCA-3'; (Dewi *et al.*, 2012), $2 \mu\text{L}$ DNA (berapa konsentrasinya $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$), dan *nuclease free water* sampai volume total menjadi $25 \mu\text{L}$. Program amplifikasi PCR adalah: pradenaturasi 94°C selama lima menit; denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus; dan ekstensi akhir 72°C selama tiga menit.

Gen β -aktin digunakan sebagai kontrol internal *loading DNA*. Primer yang digunakan adalah primer

F : 5'- TAT GAA GGT TAT GCT CTG CCC -3', dan primer β -aktin R : 5'- CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3' (Alimuddin, tidak dipublikasikan). Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: pradenaturasi 94°C selama tiga menit; denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 62°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus; dan ekstensi akhir 72°C selama tiga menit.

Produk amplifikasi PCR diseparasi dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%. Dokumentasi dilakukan menggunakan gel doc UV transiluminator. Target amplifikasi untuk *PhGH* adalah 334 bp, dan β -aktin adalah 300 bp.

Analisis Ekspresi mRNA Gen GH Eksogen

Isolasi RNA total diekstraksi dari 50 sampel (butir telur) dilakukan mengikuti prosedur *Tri Reagent Kit* (MRC/©2015 Molecular Research Center, Inc.). Selanjutnya cDNA disintesis menggunakan *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* dengan primer dT3'RACE-VECT (5'GTA ATA CGA ATA ACT ATA GGG CAG GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT TTT TTT TTT TTT-3'). Analisis ekspresi dilakukan menggunakan RT-PCR. Primer yang digunakan CcBA-PhGH-F : 5'- TCT TTA GTC AAG GCG CGA CAT TCG AGA-3', $1 \mu\text{L}$ primer CcBA-PhGH-R : 3'- CGA TAA GCA CGC CGA TGC CCA TTT TCA-5' (Dewi *et al.*, 2010). Proses amplifikasi dijalankan pada mesin PCR Applied Biosystem dengan program suhu denaturasi awal 94°C selama tiga menit; suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu *annealing* 62°C selama 30 detik dan ekstensi 72°C selama satu detik; siklus ini diulang sebanyak 35 kali; diakhiri dengan ekstensi akhir 72°C selama tiga menit dan pengkondisian akhir pada suhu 4°C . Sebagai kontrol internal digunakan gen β -aktin universal. Deteksi gen β -aktin dilakukan dengan menggunakan metode RT-PCR dengan primer *bact-F* (5'-TAT GAA GGT TAT GCT CTG CCC-3') dan *bact-R* (5'-CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3') (Alimuddin, tidak dipublikasi). Panjang fragmen β -aktin universal yang diapit oleh kedua primer tersebut sekitar 300 bp. PCR dilakukan dengan program denaturasi awal 94°C selama tiga menit; suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu *annealing* 58°C selama 30 detik, dan ekstensi 72°C selama 30 detik; siklus ini diulang sebanyak 30 kali; diakhiri dengan ekstensi akhir 72°C selama tiga menit dan pengkondisian akhir pada suhu 4°C . Untuk melihat keberhasilan amplifikasi fragmen DNA target hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose 1% dan didokumentasi dengan Gel Documentation System (Biorad). Untuk menentukan berat molekul fragmen DNA digunakan marker VC 100 bp plus DNA Leader (Vivantis). Hasil analisis PCR dievaluasi secara deskriptif.

Sebagai parameter pendukung dilakukan pengukuran pertumbuhan induk-induk F-0 yang positif membawa gen GH yang diintroduksi. Pertumbuhan diukur setiap bulan selama tujuh bulan masing-masing populasi sebanyak 30 ekor. Adapun parameter pendukung lainnya adalah kualitas air yang diukur setiap bulan meliputi parameter fisik dan kimia.

HASIL DAN BAHASAN

Induk-induk transgenik dan non-transgenik yang digunakan untuk pemijahan guna menghasilkan telur diseleksi terlebih dahulu dan dilakukan pengukuran bobot dan panjangnya. Induk F-0 yang digunakan telah mencapai umur 7-9 bulan.

Hasil dari PCR dengan templat DNA dari embrio ditampilkan pada Gambar 2A. Berdasarkan hasil PCR didapatkan bahwa semua pasangan induk yang diambil sampel untuk induk transgenik x transgenik (pemijahan A) dan transgenik x non-transgenik (pemijahan B dan C) semua positif membawa gen GH dalam tubuhnya dengan indikasi keberadaan fragmen DNA pada posisi sekitar 334 bp, yang tidak didapatkan pada embrio kontrol (pemijahan D).

Analisis ekspresi gen PhGH pada embrio ikan *B. imbellis* juga dilakukan untuk *pooled sampled* terhadap semua perlakuan. Dari empat perlakuan persilangan diperoleh hasil pada perlakuan A, B, dan C semua positif yang berarti menunjukkan bahwa gen PhGH terekspresi pada gonad F-0 (Gambar 3A). Hal tersebut juga menunjukkan bahwa β -aktin ikan mas yang digunakan mampu mengendalikan ekspresi gen PhGH terhadap ikan cupang alam *B. imbellis*. Hasil ekspresi juga menunjukkan potensi yang tinggi dihasilkan ikan transgenik F-1. Selanjutnya, keberhasilan deteksi gen GH eksogen pada embrio F-1 menunjukkan bahwa pembuatan ikan *betta* transgenik dapat dilakukan menggunakan metode transfeksi dengan *X-treme Gene*. Hal ini merupakan pertama kali dilaporkan. Selain itu, hasil yang diperoleh pada penelitian ini menjadi konfirmasi ulang keberhasilan transfeksi yang dilaporkan oleh Prasetio *et al.* (2013) menggunakan gen GFP (*Green Flourescent Protein*) sebagai reporter.

Kontrol internal dilakukan PCR dengan beta aktin universal dan menunjukkan hasil yang positif terdeteksi pada 300 bp pada semua perlakuan bak A, B, C, dan D, sedangkan sebagai pembandingan digunakan kontrol positif dari plasmid dan kontrol negatif air sebagai *template*. Hasil elektroforesis kontrol internal beta aktin tersebut ditampilkan pada Gambar 1.

Pada penelitian identifikasi induk ini belum dapat dihitung persentase keberhasilan individu yang membawa gen yang diintroduksi, karena untuk

analisis per individu diperlukan potongan organ sirip untuk diisolasi. Untuk keperluan analisis per individu masih menunggu benih dapat dipotong siripnya dan perlu dilakukan pemijahan berikutnya untuk dapat dihitung persentase yang lebih akurat per pemijahan per pasang induk. Pada penelitian terdahulu untuk *B. imbellis* yang diintroduksi gen GFP didapatkan individu positif F-1 sebesar 20%-33,33% (Kusriani *et al.*, 2012). Keberhasilan metode transfeksi *wild betta* menunjukkan nilai yang lebih rendah jika dibandingkan penelitian Sarmasik *et al.* (2001a; 2001b) terhadap ikan *Poeciliopsis lucida*. Berdasarkan penelitian tersebut, Sarmasik *et al.* (2001a; 2001b) melaporkan bahwa keberhasilan pewarisan transgen pada keturunan hasil persilangan individu F-0 transgenik x non-transgenik adalah sebesar 45%-70%. Hal tersebut kemungkinan bahan *reagen* yang digunakan berbeda dan kondisi telur juga berbeda. Pada penelitian Sarmasik *et al.* (2001a; 2001b) menggunakan metode *retroviral vector* dan ukuran telur ikan yang lebih kecil sehingga korion lebih tipis.

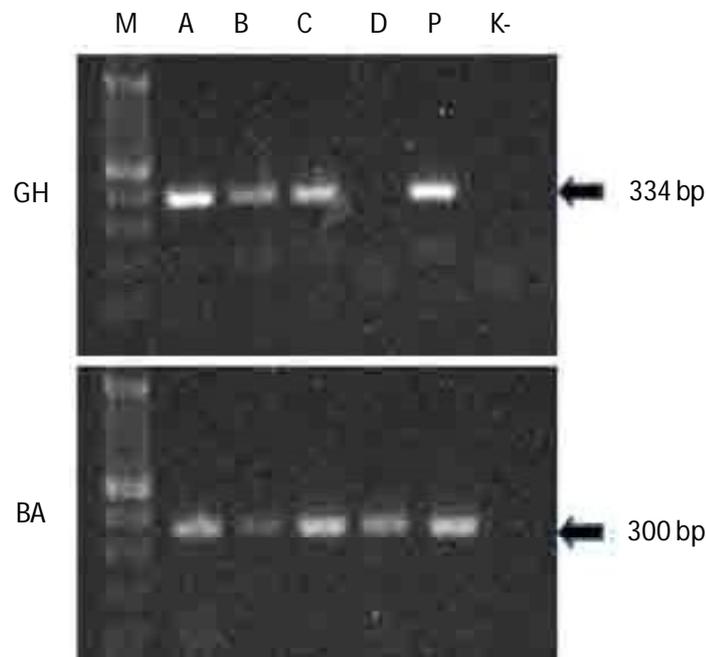
Tingkat keberhasilan pewarisan transgen pada keturunan individu F-0 *B. imbellis* transgenik ini tergolong tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Tewari *et al.* (1992). Berdasarkan Tewari *et al.* (1992) tingkat keberhasilan pewarisan transgen pada keturunan hasil persilangan ikan rainbow trout transgenik x non-transgenik pada generasi kedua adalah sebesar 3%-19%. Menurut penelitian Sun *et al.* (2005), terhadap udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang membandingkan metode antara mikroinjeksi, transfeksi, dan elektroporasi; metode transfeksi menunjukkan hasil yang lebih efektif dibandingkan mikroinjeksi dan elektroporasi. Di lain pihak, dengan metode transfeksi terhadap ikan zebra dengan bahan dasar lemak FuGene6 menghasilkan sintasan 58%. Metode transfeksi menggunakan larutan X-treme Gene, daya tetas telur *Betta imbellis* dapat mencapai 80%, jauh lebih besar dibandingkan dengan ikan zebra tersebut. Berdasarkan pertimbangan tersebut, metode transfer gen yang dapat dikembangkan pada embrio ikan yang berukuran kecil khususnya ikan hias yang pemijahannya secara alami terutama adalah metode transfeksi menggunakan larutan X-treme Gene.

Analisis RT-PCR juga menunjukkan adanya aktivitas ekspresi mRNA gen GH eksogen yang ditandai dengan fragmen DNA pada posisi yang ditargetkan pada embrio F-1, sedangkan pada kontrol tidak ada. Pada RT-PCR kontrol internal β -aktin, semua sampel memiliki produk dengan ukuran yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen yang telah disisipkan tersebut terekspresi pada semua perlakuan kecuali kontrol non-transgenik. Hasil tersebut masih harus dikonfirmasi untuk masing-masing individu pada tiap-

tiap perlakuan. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa dengan transfeksi gen GH, ekspresi gen relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (tanpa transfeksi).

Menurut Lyenger *et al.* (1996), bahwa pada awal perkembangan embrio, gen yang ditransfer akan direplikasi tanpa mengalami integrasi ke dalam genom resipien. Lebih lanjut dijelaskan bahwa setelah mengalami beberapa pembelahan sel, sebagian gen asing tersebut terintegrasi secara acak ke dalam genom resipien di salah satu *blastomer* sehingga akan terdapat dua macam sel yaitu sel yang membawa transgen dan sel yang tidak membawa transgen. Menurut Chou *et al.* (2001), ketika fragmen DNA yang terdiri atas suatu gen target atau gen penanda homolog maupun heterolog ditransfer, maka akan sangat umum menemukan kejadian mosaik. Selain itu,

menurut Alimuddin *et al.* (2003), selain terintegrasi ke dalam genom, ada sebagian dari gen asing berada dalam suatu posisi ekstrakromosomal. Lebih lanjut dijelaskan bahwa gen asing yang terintegrasi akan stabil di dalam genom, sementara dalam bentuk ekstra kromosomal akan terdegradasi oleh *endogeneous nuclease*. Berdasarkan hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa gen yang telah disisipkan tersebut terekspresi, walaupun kemungkinan tidak semua mengekspresikan transgen untuk seluruh populasi F-1 apabila dianalisis per individu, mengingat pada tahap identifikasi ini masih merupakan *pooled sampled*. Selain itu, dapat juga memperlihatkan bahwa gen GH yang disisipkan dapat ditransmisikan pada keturunannya, sehingga induk F-0 tersebut merupakan *germline transmitter*. Rahman & Maclean (1999) melakukan penyisipan gen GH ikan salmon-gen anti beku *ocean pout* (OPAFPCsGH), laju

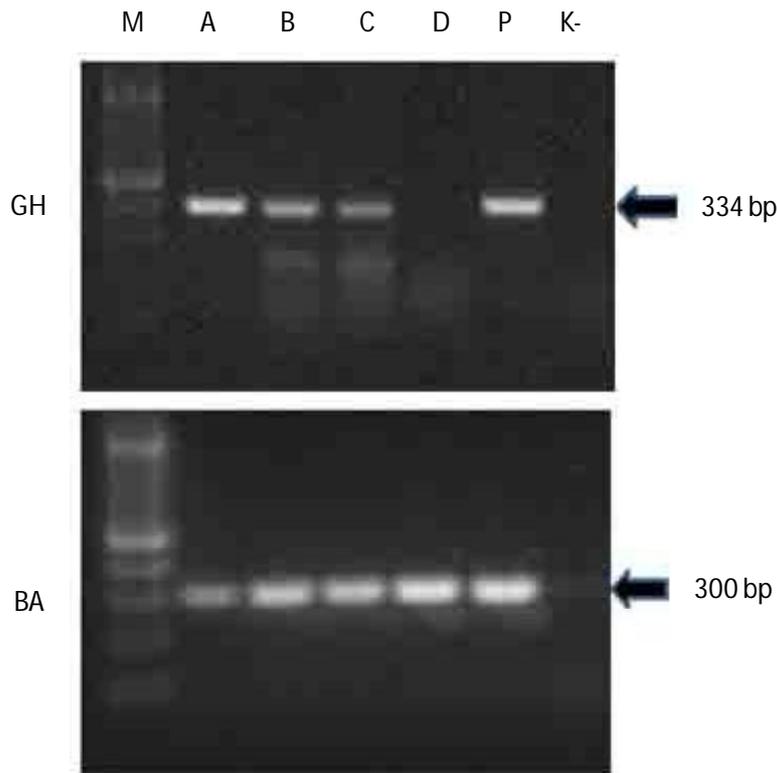


Keterangan: M= marka 100 bp (Vivantis); A= embrio dari pemijahan transgenik x transgenik F-0; B= pemijahan jantan transgenik F-0 x betina non-transgenik; C= pemijahan jantan non-transgenik x betina transgenik F-0; D= pemijahan non-transgenik x non-transgenik; P= kontrol positif plasmid; K= kontrol negatif NFW. Angka di sebelah kanan gambar (334 bp dan 300 bp) masing-masing adalah ukuran produk PCR untuk gen GH ikan patin dan β -aktin ikan betta

Note: M= marka 100 bp (Vivantis); A= spawning of F-0 transgenic x transgenic; B= spawning of F-0 transgenic male x non-transgenic; C= spawning of non-transgenic x F-0 transgenic female; D= spawning of non-transgenic x non-transgenic; P= positive control plasmid; K= negative control NFW. 334 bp= fragment size of GH pangasius gen; 300 bp= fragment size of β -actin universal

Gambar 1. Hasil PCR menggunakan primer spesifik gen penyandi hormon pertumbuhan ikan patin (GH) dan β -aktin (BA) dengan templat DNA yang diekstraksi dari kumpulan embrio ikan *betta* keturunan pertama

Figure 1. Result of PCR by specific primer gene marker from pangasius with template DNA that was extracted from pooled embryos of first generation of betta fish



Keterangan: M= marka 100 bp (Vivantis); A= embrio dari pemijahan transgenik x transgenik F-0; B= pemijahan jantan transgenik F-0 x betina non-transgenik; C= pemijahan jantan non-transgenik x betina transgenik F-0; D= pemijahan non-transgenik x non-transgenik; P= kontrol positif plasmid; K= kontrol negatif NFW. Angka di sebelah kanan gambar (334 bp dan 300 bp) masing-masing adalah ukuran produk PCR untuk gen GH ikan patin dan β -aktin ikan betta

Note: M= marka 100 bp (Vivantis); A= spawning of F-0 transgenic x transgenic; B= spawning of F-0 transgenic male x non-transgenic; C= spawning of non-transgenic x F-0 transgenic female; D= spawning of non-transgenic x non-transgenic; P= positive control plasmid; K= negative control NFW. 334 bp= fragment size of GH pangasius gen; 300 bp= fragment size of β -actin universal

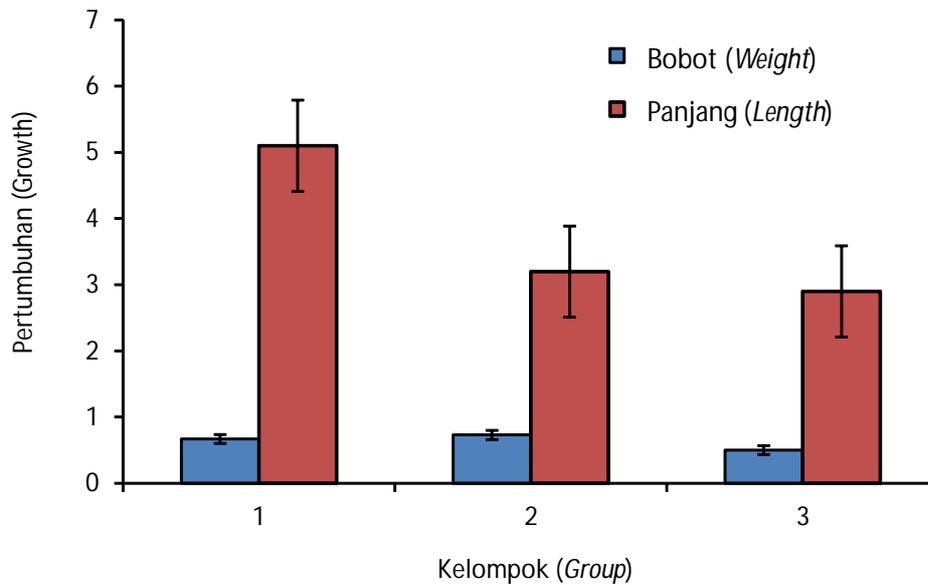
Gambar 2. Hasil RT-PCR menggunakan primer spesifik gen penyandi hormon pertumbuhan ikan patin (GH) dan β -aktin (BA) dengan *template* cDNA dari kumpulan embrio ikan betta keturunan pertama

Figure 2. Results of RT-PCR by specific primer growth hormone of pangasius as marker gene and β -aktin with *tempelate* cDNA from polled embryos for first generation of betta fish

germline transmission dari F-0 ke F-1 hanya kurang dari 10%, namun laju transmisi transgen dari F-1—F-2 adalah sekitar 50% (sesuai dengan hukum Mendel). Berdasarkan hasil penelitian Kobayashi *et al.* (2007) yang juga menggunakan gen mBP-*tiGH* pada generasi pertama ditransmisikan sebesar 5,71% dan 14,3%. Setiap individu yang terintegrasi gen asing ke dalam genom akan ditransmisikan kepada keturunannya. Untuk mengaplikasikan teknik ini pada akuakultur maka produksi massal ikan transgenik diperlukan (Yoshizaki *et al.*, 2001). Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa individu ikan *Betta imbellis* founder (induk) membawa gen yang telah disisipkan kepada keturunannya sebesar 16% pada generasi pertama

(Kusriani *et al.*, 2014). Hasil tersebut untuk F-0 cukup tinggi apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya meskipun menggunakan metode yang berbeda-beda. Hasil penelitian sebelumnya pada ikan nila transgenik dengan konstruksi gen yang sama memberikan hasil transmisi pada generasi pertama sebesar 5,7%-14,3%. Pada ikan *mud loach* laju transmisi transgen pada generasi pertama bervariasi berkisar antara 2%-33% (Nam *et al.*, 2001). Menurut Alimuddin *et al.* (2005), laju transmisi transgen pada generasi pertama bervariasi antara 4,2%-44,1%.

Sebagai parameter pendukung dalam pembesaran sampai pematangan gonad induk-induk F-0 diamati



Gambar 3. Pertumbuhan induk-induk F-0 pada umur tujuh bulan yang digunakan untuk koleksi embrio yang terdiri atas tiga kelompok

Figure 3. Growth of F-0 broodstock at seven months old, that was use for embryonic collection, consisted of three groups

pula pertumbuhan secara berkala. Adapun hasil pengamatan panjang dan bobot induk-induk F-0 yang digunakan untuk koleksi telur dan larva ditampilkan pada Gambar 3. Berdasarkan hasil pengamatan selama tujuh bulan induk-induk F-0 yang positif membawa gen GH diperoleh pertumbuhan panjang dan bobot yang berbeda antara perlakuan dengan kontrol. Induk-induk F-0 yang positif membawa gen merupakan hasil introduksi embrionya dan telah berumur tujuh bulan ke atas. Transfeksi embrio F-0 yang telah dilakukan oleh Kusriani *et al.* (2016) menggunakan berbagai konsentrasi DNA yaitu dari 0,25 μL ; 0,50 μL ; dan 0,75 μL dengan konsentrasi transfast 0,75 μL .

Berdasarkan hasil penelitian tentang perbedaan konsentrasi DNA, telah didapatkan konsentrasi 0,25 μL dan transfast 0,75 μL memberikan pertumbuhan panjang yang paling baik. Oleh karena itu, untuk produksi individu F-1 selanjutnya menggunakan induk-induk F-0 yang telah membawa gen GH hasil introduksi 0,25 μL DNA dan 0,75 μL transfast. Induk-induk *B. imbellis* transgenik F-0 memiliki panjang dan bobot yang bervariasi. Data pertumbuhan untuk induk-induk F-0 ini tidak dapat dianalisis secara statistik karena jumlah individu per perlakuan per ulangan tidak sama sehingga penampilan hasil secara deskriptif.

Berdasarkan penelitian ini, beberapa individu transgenik menunjukkan laju pertumbuhan panjang yang pesat, namun untuk pertumbuhan bobot relatif

sama antar ulangan. Pada ikan *B. imbellis*, transfer gen PhGH yang berasal dari spesies yang sangat berbeda memberikan ekspresi yang sama antar perlakuan. Keberhasilan transfer gen PhGH eksogen ke dalam resipien dan efeknya pada pertumbuhan, penggunaan konsentrasi DNA 25 μL dan transfast 0,75 μL optimal untuk memproduksi ikan *B. imbellis* transgenik. Hal ini sangat perlu evaluasi selanjutnya yaitu tingkat transmisi dan laju pertumbuhan individu F-1 untuk memberikan informasi yang lebih lengkap.

Faktor yang tidak kalah penting terhadap pertumbuhan induk ikan cupang F-0 hasil transgenik adalah faktor lingkungan yaitu kualitas air. Pengamatan parameter kualitas air dilakukan setiap bulan untuk memantau fluktuasi lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan ikan yang digunakan untuk memproduksi benih selanjutnya. Parameter kualitas air yang diukur meliputi suhu, pH, oksigen terlarut, kesadahan, alkalinitas, amonia, dan konduktivitas. Adapun data pengamatan kalitas air ditampilkan pada Tabel 1. Kualitas air selama pemeliharaan masih berada pada kisaran yang optimal untuk pemeliharaan ikan cupang karena nilai yang dihasilkan di atas standar baku mutu sesuai PP No. 82 untuk kegiatan budidaya ikan air tawar. Kesadahan pada tendon dan akuarium sangat tinggi, jauh di atas standar. Tetapi hal tersebut tidak terlalu memengaruhi perkembangan dan kehidupan ikan cupang.

Tabel 1. Kualitas air selama pemeliharaan
Table 1. Water quality during rearing periods

Parameter Parameters	Tandon Reservoir	Akuarium Aquarium	Standar Standard	Referensi Reference
Suhu Temperature (°C)	26.0-27.30	26.30-29.30	24-30	IBC (2004)
pH	6.89-7.72	6.05-8.49	5.2-6.8	IBC (2005)
Oksigen terlarut Dissolved oxygen (mg/L)	4.24-7.42	4.71-6.43	> 5	IBC (2006)
Kesadahan Hardness (mg/L)	23.10-46.20	40.04-63.14	8-10	IBC (2007)
Alkalinitas Alkalinity (mg/L)	33.98-56.64	11.33-56.64	0.02	PP No. 82 (2001)
Amonia-N Ammonia-N (mg/L)	0.00-0.195	0.00-0.01	≤ 1	PP No. 82 (2002)
Nitrit-N Nitrite-N (mg/L)	0.001-0.022	0.00-0.04		
Konduktivitas Conductivity (µS)	2.87-154.20	4.07-209.50		

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi dapat disimpulkan ikan transgenik F-0 *germline transmitter* dapat dihasilkan menggunakan metode transfeksi. Promoter ccBA dapat mengendalikan ekspresi mRNA gen GH eksogen pada ikan betta. Keberhasilan transfer gen PhGH eksogen ke dalam resipien dan efeknya pada pertumbuhan, dan induk-induk F-0 yang positif selanjutnya dapat digunakan untuk memproduksi benih F-1 transgenik GH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim peneliti dan teknisi genetika Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias atas bantuan selama penelitian. Penelitian ini dibiayai oleh DIPA tahun anggaran 2015.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Yoshizaki, G., Carman, O., & Sumantadinata, K. (2003). Aplikasi transfer gen dalam akuakultur. *J. Akuat. Indonesia*, 2(1), 41-50.
- Alimuddin, Yoshizaki, G., Kiron, V., Satoh, S., & Takeuchi, T. (2005). Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon Å6-desaturase-like gene in zebrafish. *Trans. Res.*, 14, 159-165.
- Dewi, R.R.S.P.S., Alimuddin, Sudradjat, A.O., & Somantadinata, K. (2012) Efektivitas transfer dan ekspresi gen PhGH pada ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 7(2), 171-180.
- Chou, C.Y., Horng, L.S., & Tsai, H.J. (2001). Uniform GFP-expression in transgenic medaka *Oryzias latipes* at the F0 generation. *Transgenic Research*, 10: 303-315.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagy, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., & Chan, W.K. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371, 209-210.
- Du, S.J., Gong, Z., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., & Hew, C.L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biol. Tech.*, 10, 176-180.
- Hackett, P.B. (1993). The molecular biology of transgenic fish. (p. 207-240). In Hochachka, P.W., & Mommsen, T.P. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier Science. Amsterdam, Vol. 2.
- Kobayashi, S., Alimuddin, Morita T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2007). Transgenic nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270, 427-435.

- Kusrini, E., Kusumah, R.V., Prasetio, A.B., Murniasih, S., Rahmawati, R., Cindelaras, S., & Alimuddin. (2012). Verifikasi individu F-0 calon induk ikan wild betta (*Betta sp.*) hasil rekayasa genetika. Laporan Hasil Penelitian 2012, 15 hlm.
- Kusrini, E., Hayuningtyas, E.P., Rahmawati, R., Kusumah, R.V., & Cindelaras, S. (2014). Transfer gen hormon pertumbuhan pada embrio wild betta, *Betta imbellis*. Laporan Hasil Penelitian 2014, 13 hlm.
- Lyengar, A., Muller, F., & Maclean, N. (1996). Regulation and expression of transgenes in fish—a review. *Transgenic Research*, 5, 147-166.
- Maclean, N., Penman, D., & zhu, Z. (1987). Introduction of novel genes into fish. *Biotechnology*, 5, 257-261.
- Nam, Y.K., Maclean, N., Fu, C., Pandian, T.J., & Eguia, M.R.R. (2007). Development of transgenic fish: scientific background. In Kapuscinski, A.R., Hayes, K.R., Li, S., & Dana, G. (Eds.). *Environmental risk assessment f genetically modified organisms*, Vol. 3. Methodologies for transgenic fish. CABI, UK, p. 61–94.
- Rahman, M.A., Hwang, G., Razak, S.A., Sohm, F., & MacLean, N. (2000). Copy number dependent transgene expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Trans. Res.*, 9, 417-427.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, G., & Kim, D.S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Trans. Res.*, 10, 353-362.
- Nam, Y.K., Maclean, N., Hwang, G., & Kim, D.S. (2008). Autotransgenic and allotransgenic of growth traits in fish for aquaculture: a review. *J. Fish. Biol.*, 72, 1-26.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, G., & Kim, D.S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Trans. Res.*, 10, 353-362.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., & Rosenfeld, M.G. (1982). Dramatic growth of mice that developed from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 30, 611-615.
- Parentrengi, A., Alimuddin, Sukenda, Sumantadinata, K., & Tenriulo, A. (2010). Uji aktivitas promoter antivirus pada udang windu *Penaeus monodon* menggunakan gen EGFP sebagai penanda. *Forum Inovasi Teknologi Akuakultur (FITA)*. Lampung, 18 hlm.
- Prasetio, A.B., Kusrini, E., Kusumah, R.V., Cindelaras, S., & Murniasih, S. (2013). Efektivitas metode transfeksi dalam transfer gen pada zigot ikan cupang alam (wild betta) *Betta imbellis*. *J. Ris. Akuakultur*, 8(2), 191-199.
- Rahman, M.A., & Maclean, N. (1999). Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene. *Aquaculture*, 173, 333-346.
- Robles, V., & Cancela, M.L. (2007). Lipid-based transfection as a method for gene delivery in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquaculture Research*, 38, 1317-1322.
- Sarmasik, A., Jang, I.K., Chun, C.Z., Lu, J.K., & Chen, T.T. (2001a). Transgenic live-bearing fish and crustaceans produced by transforming immature gonads with replication-defective pantropic retroviral vectors. *Marine Biotechnology Vol. 3, Issue 5, pp 470-477*.
- Sarmasik, A., Chun, C.Z., Jang, I.K., Lu, J.K., & Chen, T.T. (2001b). Production of transgenic live-bearing fish and crustaceans with replication-defective pantropic retroviral vectors. *Marine Biotechnology*, 3(1), S177-S184.
- Sun, P.S., Venzon, N.C., Calderon, F.R.O., & Esaki, D.M. (2005). Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 243, 19-26.
- Tewari, R., Michard-Vanhee, C., Perrot, E., & Chourout, D. (1992). Mendelian transmission, structure and expression of transgenes following their injection into the cytoplasm of trout eggs. *Transgenic Res.*, 1, 250-260.
- Yoshizaki, G. (2001). Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49, 137-142.
- Yaskowiak, E.S., Shears, M.A., Agarwal-Mawal A., & Fletcher, G.L. (2006). Characterization and multi-generational stability of the growth hormone transgene (EO-1á) responsible for enhanced growth rates in Atlantic salmon. *Trans. Res.*, 15, 465-480.