

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

IDENTIFIKASI ZIGOSITAS IKAN LELE (*Clarias gariepinus*) TRANSGENIK F-2 YANG MEMBAWA GEN HORMON (PhGH) DENGAN MENGGUNAKAN METODE *REALTIME-qPCR*

Huria Marnis^{*)#}, Bambang Iswanto^{*)}, Romy Suprpto^{*)}, Imron^{*)}, dan Raden Roro Sri Pudji Sinarni Dewi^{**)}

^{*)} Balai Penelitian Pemuliaan Ikan

^{**)} Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan

ABSTRAK

Produktivitas ikan budidaya dapat ditingkatkan melalui teknologi transgenesis. Populasi ikan lele transgenik cepat tumbuh telah dihasilkan dan karakter biologisnya telah diketahui. Namun informasi sigositas ikan lele transgenik perlu ditelaah. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi sigositas ikan lele transgenik F2. Sigositas ikan lele transgenik diidentifikasi dengan menggunakan metode real-time qPCR (RT-qPCR) dan uji progeneri. Identifikasi sigositas melalui uji progeneri, dilakukan dengan mendeteksi transgen (PhGH) pada individu-individu F3 hasil persilangan transgenik F2 dengan non transgenik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sigositas pada ikan lele transgenik F2 dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode RT-qPCR. Semua ikan transgenik F2 adalah heterosigot, dengan nilai $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yang hampir sama tiap individu F2, yaitu berkisar 0,80-0,99. Identifikasi sigositas dengan metode RT-qPCR menunjukkan hasil yang sama dengan uji progeneri, semua transgenik F2 tidak menghasilkan 100% anakan F3 positif transgen. Pada uji progeneri, transmisi transgen pada penelitian ini tidak mengikuti hukum segregasi Mendel, dengan kisaran sebesar 5-40%.

KATA KUNCI: *Clarias gariepinus*; sigositas; transgenik; hormon pertumbuhan

ABSTRACT: *Identification of zygosity F2 transgenic African catfish (Clarias gariepinus) with growth hormone gene (PhGH) by using realtime-qPCR method. By: Huria Marnis, Bambang Iswanto, Romy Suprpto, Imron, and Raden Roro Sri Pudji Sinarni Dewi*

Fish farming productivity can be increased by transgenesis technology. On the previous study, transgenic African catfish population fast growing has been produced and its biological characters has been known. However information of transgenic zygosity of African catfish should be examined. The aim of this study was to identify the zygosity of F2 transgenic African catfish. The zygosity of F2 transgenic was identified by real-time qPCR (RT-qPCR) method and progeny test. Further, identification of zygosity F2 transgenic African catfish was confirmed by progeny test, while F2 transgenic African catfish was mated with non-transgenic. Identification of zygosity F2 transgenic was conducted by detection PhGH gene (transgene) in F3 transgenic African catfish population. Transgene transmission was evaluated by PCR method. The result showed that the zygosity F2 transgenic African catfish could be identified by RT-qPCR method. All F2 transgenic African catfish were heterozygous, where as the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ value was almost same for all individual, which ranges from 0.80 to 0.99. The result of zygosity identification using RT-qPCR method was as same as that of progeny test. In the progeny test, transgene transmission in this study was non-Mendelian segregation, with ranges of 5-40%.

KEYWORDS: *Clarias gariepinus*; zygosity; transgenic; growth hormone

PENDAHULUAN

Studi tentang ikan transgenik telah banyak dikembangkan dengan baik. Keberhasilan pembentukan ikan transgenik ditunjukkan dengan

transgen yang diintroduksi dapat diwariskan dan ikan transgenik tersebut memiliki performa yang unggul pada karakter yang diharapkan. Selain itu, keberhasilan pembentukan ikan transgenik dapat juga ditentukan dari zigositasnya. Saat ini, penelitian tentang identifikasi zigositas pada ikan transgenik telah banyak dilakukan seperti pada ikan nila (*Oreochromis sp.*) (Martinez *et al.*, 1996, 1999; Rahman *et al.*, 1998, 2001), mud loach (*Misgurnus mizolepis*) (Nam *et al.*,

Korespondensi: Balai Penelitian Pemuliaan Ikan. Jl. Raya 2 Pantura Sukamandi, Patokbeusi, Subang 41263, Jawa Barat, Indonesia. Tel.: + (0260) 520662
E-mail: huria_marnis@yahoo.com

2001; 2002), salmon Atlantik (*Salmo salar*) (Fletcher *et al.*, 2011) dan coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Devlin *et al.*, 2004). Ikan transgenik heterozigot dan homozigot tidak dapat dibedakan secara langsung, namun pada kegiatan pemuliaan dan produksi diperlukan identifikasi ikan transgenik heterozigot dan homozigot.

Transgen yang terintegrasi secara random pada genom ikan tidak dapat dianalisis genotipenya menggunakan sekuensing. Klasifikasi zigositas hanya dapat dilakukan dengan menggunakan pengukuran jumlah kopi transgen secara kuantitatif, pada ikan transgenik homozigot terdapat perbedaan jumlah kopi transgen sebesar dua kali jika dibandingkan dengan ikan transgenik heterozigot (Zhong *et al.*, 2012). Beberapa metode yang telah berhasil dilakukan untuk mengidentifikasi zigositas ikan transgenik adalah dengan menggunakan metode *Southern blot* dan analisis semi-kuantitatif PCR Martinez *et al.* (1999), real-time PCR menggunakan TaqMan Probe (Bubner *et al.*, 2004; Mitreèiæ *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2005) dan baru-baru ini pengembangan sistem identifikasi zigositas dengan menggunakan SYBR Green real-time PCR telah dilakukan pada mencit transgenik, metode ini sangat mudah dan murah (Haurogné *et al.*, 2007; Sakurai *et al.*, 2008).

Pada penelitian sebelumnya telah dihasilkan ikan lele transgenik F-1 heterozigot dengan performa pertumbuhan dua kali lipat lebih baik dibanding non-transgenik. Ikan lele F-1 diharapkan dapat mewariskan karakter pertumbuhan cepat pada generasi kedua (F-2). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi zigositas ikan lele transgenik F-2 menggunakan metode RT-qPCR. Informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk mengidentifikasi zigositas pada pembentukan ikan lele transgenik maupun pada jenis ikan transgenik lainnya.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan untuk identifikasi zigositas dengan RT-qPCR adalah ikan lele Afrika transgenik F-2. Identifikasi zigositas dengan uji progeni masing-masing menggunakan 14 ekor ikan lele transgenik F-2 betina disilangkan secara buatan dengan jantan non-transgenik dan 14 ekor ikan lele transgenik F-2 jantan disilangkan secara semi-buatan dengan betina non-transgenik, sehingga menghasilkan keturunan ikan lele transgenik generasi F-3. Konstruksi plasmid yang digunakan adalah pCcBA-PhGH (Dewi, 2010).

Identifikasi Zigositas Individu Ikan Transgenik F-2 dengan RT-qPCR

Penyiapan Genom DNA

Genom DNA dari 14 ekor ikan lele dari jaringan sirip ekor diekstraksi menggunakan kit GeneJet Genomic DNA Purification (*Thermo Scientific*) sesuai protokol yang tersedia. Protokol meliputi tahapan lisis sel, presipitasi DNA, pengikatan DNA pada *column*, pencucian dan elusi DNA. Secara singkat, sirip ekor sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge tube* 1,5 mL dan ditambahkan 180 μ L *digestion solution* dan 20 μ L proteinase-K. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama tiga jam. RNase ditambahkan sebanyak 20 μ L dalam larutan, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Sampel kemudian ditambahkan 200 μ L *lysis solution* dan di-*vortex* sampai homogen selama 15 detik. Sebanyak 400 μ L etanol 50% ditambahkan ke dalam sampel, selanjutnya sampel dipindahkan ke dalam *column*, disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 x g selama satu menit. DNA yang mengikat pada *column* dicuci sebanyak dua kali dengan 500 μ L larutan *wash buffer* dan disentrifugasi pada 8.000 x g selama tiga menit (pencucian pertama) dan 12.000 x g selama tiga menit untuk pencucian kedua. DNA dilarutkan dengan menambahkan 200 μ L *elution buffer*, dan disentrifugasi 8.000 x g selama satu menit. Kualitas dan kuantitas Genom DNA yang diperoleh dicek dengan menggunakan gel agarose 1,5% dan alat Qubit 2.0 fluorometri (*invitrogen*) dengan metode fluorometrik. Pengukuran konsentrasi genom DNA dilakukan dengan pengenceran sampel 100x yang diencerkan dengan *nuklease free water*. Pada metode ini kemurnian genom DNA dari RNA dan protein pengkontaminan dapat diketahui dengan menggunakan kombinasi kit *Qubit RNA Assay* dan kit *Qubit protein Assay*. Genom DNA dikatakan murni, jika konsentrasi RNA dan konsentrasi protein tidak terdeteksi. Selanjutnya genom DNA disimpan pada suhu -20°C sebelum dikerjakan untuk langkah berikutnya.

Real Time Kuantitatif PCR

Pada ikan lele transgenik homozigot, jumlah kopi transgen (nilai *cycle threshold*) dua kali lipat lebih besar jika dibandingkan dengan ikan lele transgenik heterozigot, dibedakan dengan menggunakan metode kuantitatif RT-qPCR. Gen β -aktin digunakan sebagai referensi gen karena gen ini umumnya terdapat dalam genom ikan lele dan mempunyai jumlah kopi gen yang stabil. Zigositas pada ikan transgenik ditentukan dengan menggunakan rumus siklus komparatif *thresh-*

old (Ct) : $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nilai Ct untuk transgen dan referensi gen yang ditentukan secara eksperimental dan ΔCt ($\Delta Ct = pCt_{BA-PhGH} - \beta\text{-aktin}$). Nilai $\Delta\Delta Ct$ didapat dengan membandingkan nilai ΔCt ikan lele transgenik F-2 yang belum diketahui zigositasnya dengan ΔCt ikan lele transgenik F1 yang sudah diketahui zigositasnya ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sampel}} - \Delta Ct_{\text{kalibrator}}$).

Jumlah kopi transgen dianalisis dengan Rotor-gene Q software (Qiagen) dan alat Rotor Gene (Qiagen) menggunakan kit Rotor-Gene SYBR Green (Qiagen) dengan tiga kali ulangan. Sebanyak 20 ng/ μL DNA digunakan sebagai *template*, 1 μM primer ActPhGH-F (5'-ACA GGTACA TCT GGCGATCA -3') dan ActPhGH-R (5'-GCG TCCAGT CTC CATAATGAC-3') dengan ukuran fragmen 60 bp. Primer β -aktin yang digunakan adalah bact-F (5'-TATGAA GGT TAT GCT CTG CCC-3') dan bact-R (5'-CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3') (Dewi, 2010). Panjang fragmen β -aktin ikan lele yang diapit oleh kedua primer tersebut sekitar 300 bp. Proses amplifikasi transgen dan β -aktin diawali dengan suhu 95°C selama dua menit, 94°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, sebanyak 40 siklus.

Identifikasi Zigositas Individu Ikan Transgenik F-2 dengan Uji Progeni

Uji progeni dilakukan untuk mengidentifikasi zigositas ikan lele transgenik F-2. Identifikasi zigositas dilakukan dengan mendeteksi keberadaan transgen pada individu-individu F-3 hasil persilangan dari induk F-2 dan mengevaluasi transmisi transgen dari F-2 ke F-3 dengan menggunakan metode PCR.

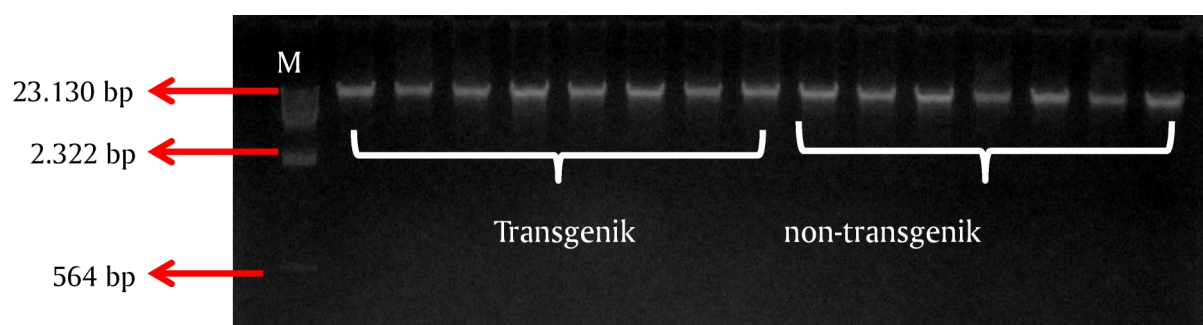
Genom DNA pada masing-masing populasi F-3 dari 14 induk F-2 diekstraksi menggunakan kit GeneJet Genomic DNA Purification (Thermo Scientific) sesuai

dengan petunjuk penggunaan. Identifikasi keberadaan transgen dilakukan pada genom DNA hasil ekstraksi dengan PCR menggunakan kit *fast start PCR* (Roche, Germany) dan diamplifikasi dengan *mycycler PCR* (Biorad). Komposisi larutan yang digunakan untuk proses amplifikasi PCR adalah 10 μL master kit PCR; 1,5 μL primer (10 pmol/ μL), 2 μL DNA genom dan ditambahkan *water free RNA* sehingga mencapai total volume 25 μL . Primer yang digunakan adalah ACT-107 F (5'-GTGTGT GAC GCT GGA CCA ATC -3') dan phGH2 R (5'-CGATAA GCA CGC CGA TGC CCA TTT-3') dengan ukuran fragmen 1.500 bp. Proses amplifikasi PCR dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama satu menit, sebanyak 35 siklus. Hasil PCR dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis pada gel agarose (vivantis) 2,0% dalam larutan TAE 1x selama 60 menit pada tegangan 60 volt. Sebanyak 3 μL volume ampikon dicampur dengan *loading dye* 1,0 μL . Gel *distaining* dengan gel red (*biotium*) dengan konsentrasi 1 $\mu g/mL$. Hasil elektroforesis DNA divisualisasi menggunakan UV transilluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Ekstraksi DNA

Hasil ekstraksi genom DNA dari ikan lele transgenik dan non-transgenik telah berhasil dilakukan dengan kemurnian yang cukup tinggi. Hasil ekstraksi genom menunjukkan adanya fragmen DNA tunggal berukuran > 23.130 bp yang relatif bersih dari protein, RNA, dan kontaminan lainnya (Gambar 1). Pita genom DNA bersih tanpa latar belakang "smear" dan tidak adanya pita yang kabur pada posisi berat molekul yang rendah. Hal ini mengindikasikan tingkat



Gambar 1. Genom DNA ikan lele transgenik F-2 dan non-transgenik yang diekstraksi dengan kit GeneJet Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). M adalah marker DNA lambda DNA/Hind III (Vivantis). Ukuran genom DNA adalah > 23.130 bp

Figure 1. DNA genom of F-2 transgenic and non-transgenic African catfish that have been extracted by GeneJet Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). M indicates DNA lambda DNA/Hind III marker (Vivantis). The DNA genom size is >23,130 bp

kemurnian DNA yang baik. Menurut Linacero *et al.* (1998), pita genom DNA yang bersih tanpa ada fragmentasi pita atau *smear* mengindikasikan tingkat kemurnian DNA yang baik (DNA tidak terdegradasi serta terkontaminasi). Prinsip dasar ekstraksi DNA adalah serangkaian proses untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen lainnya.

Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Selain dari hasil elektroforesis, keberhasilan proses ekstraksi dapat diketahui dari hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian genom DNA menggunakan metode fluorometrik. Hasil konsentrasi genom DNA pada ikan lele transgenik berkisar dari 449-772 µg/mL dengan rata-rata 562,47 ± 95,27 µg/mL; sedangkan konsentrasi genom DNA pada ikan lele non-transgenik berkisar dari 429-727 µg/mL dengan rata-rata 550,73 ± 103,53 µg/mL (Tabel 1).

Metode fluorometrik dapat mengukur konsentrasi DNA secara akurat dan tepat dibandingkan metode absorbansi UV menggunakan spektrofotometer. Pada

metode fluorometrik, setiap pewarna spesifik untuk satu jenis molekul: DNA, RNA atau protein. Pewarna ini memiliki fluoresensi sangat rendah dan dapat mengikat asam nukleat (DNA, RNA atau protein), sehingga lebih akurat (Schweitzer & Scaiano, 2003; McKnight *et al.*, 2006). Sedangkan prinsip metode spektrofotometer adalah berdasarkan rasio A_{260}/A_{280} , di mana semakin banyak DNA, RNA atau protein dalam sampel, maka lebih banyak cahaya yang diserap. Metode ini menggunakan absorbansi cahaya pada 260 nm (untuk DNA dan RNA) atau 280 nm (untuk protein). Namun, begitu banyak molekul menyerap cahaya pada 260 nm dan 280 nm, sehingga pengukuran ini membutuhkan ketelitian tinggi karena potensi kontaminasi dari sampel dengan molekul-molekul lainnya. Selain itu, dengan menggunakan metode absorbansi, tidak mungkin dapat membedakan antara DNA, RNA, protein, nukleotida bebas atau asam amino dalam sampel, sehingga menyebabkan pengukuran sangat tidak akurat (Glasel, 1995; Huberman, 1995; Manchester, 1995).

Tabel 1. Tingkat kemurnian dan konsentrasi genom DNA (µg/mL) pada sampel ikan lele transgenik F-3 dan non-transgenik

Tabel 1. Purity level and DNA genom concentration (µg/mL) of F2 transgenic African catfish and non-transgenic

Konsentrasi DNA ikan lele transgenik F-2 DNA concentration of F-2 transgenic African catfish (µg/mL)	Konsentrasi RNA yang terukur RNA concentrations were measured (ng/mL)	Konsentrasi protein yang terukur Protein concentrations were measured (µg/mL)	Konsentrasi DNA ikan lele non-transgenik DNA concentration of non-transgenic African catfish (µg/mL)	Konsentrasi RNA yang terukur RNA concentrations were measured (ng/mL)	Konsentrasi protein yang terukur Protein concentrations were measured (µg/mL)
545			591		
647			594		
549			595		
449			603		
557			603		
462			523		
464	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi	727	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
468	No detected	No detected	429	No detected	No detected
468			432		
670			556		
564			457		
565			458		
772			461		
677			765		
580			467		
Rata-rata Average	562.47 ± 95.27		550.73 ± 103.53		

Pengukuran konsentrasi yang tepat sangat diperlukan pada penelitian ini, sehingga hasil konsentrasi genom DNA dapat diketahui dengan pasti. Selain konsentrasi genom DNA, kemurnian genom DNA dengan metode ini dapat diketahui secara pasti dengan menggunakan kombinasi kit DNA, RNA, dan protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genom DNA mempunyai kemurnian yang tinggi karena konsentrasi RNA dan protein tidak terdeteksi. Metode ini memberikan informasi kemurnian yang lebih akurat jika dibandingkan dengan metode rasio absorbansi UV menggunakan spektrofotometer A_{260}/A_{280} , karena dengan metode ini dapat diketahui berapa banyak DNA, RNA, dan protein yang ada pada sampel secara tepat dan akurat (Schweitzer & Scaiano, 2003).

Identifikasi Zigositas Individu Ikan Transgenik F-2

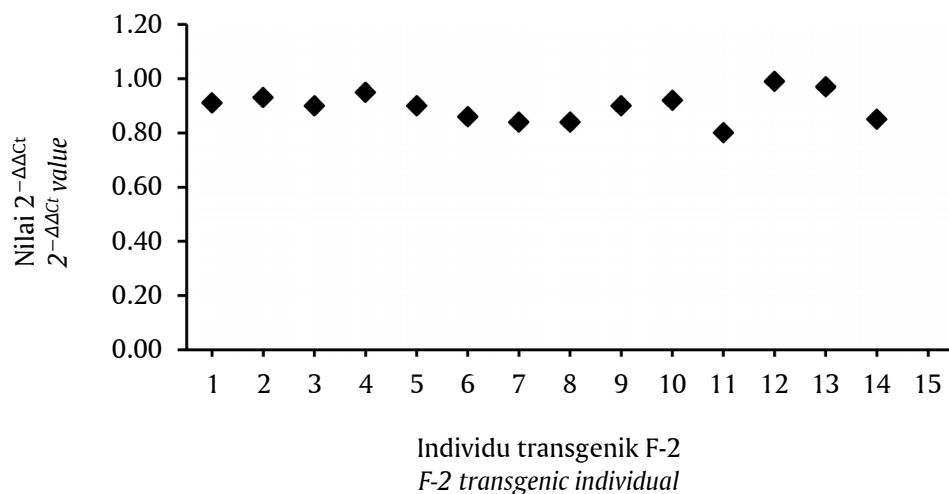
Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua ikan transgenik yang diidentifikasi dan diklarifikasi secara jelas sebagai ikan lele transgenik heterozigot dan tidak ditemukan lele transgenik homozigot. Hal ini ditunjukkan dengan nilai $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pada individu ikan transgenik F-2 berkisar 0,80-0,99 (Gambar 2). Nilai $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pada individu-individu ikan lele transgenik hampir sama dan tidak ada nilai $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yang tingginya mencapai dua kali lipat. Menurut Alimuddin *et al.* (2007), nilai perbandingan jumlah kopi transgen/referensi gen ikan transgenik heterozigot dengan homozigot mendekati angka teoritis yaitu 1 : 2, dengan asumsi satu integran dalam genom.

Identifikasi zigositas dengan metode RT-qPCR menunjukkan hasil yang sama dengan uji progeneri yang dilakukan pada 14 induk F-2 yang dikawinkan dengan ikan non-transgenik. Pada uji progeneri dapat terlihat bahwa transmisi transgen dari F-2 ke F-3 berkisar 5%-40%, transmisi transgen dari induk betina F-2 berkisar 5%-30% dan 5%-40% dari induk jantan (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa masih ada individu yang tidak membawa transgen (Gambar 3). Transgen pada ikan lele transgenik F-2 belum stabil, sehingga mengakibatkan pola pewarisan transgen dari F-2 ke F-3 juga tidak mengikuti hukum segregasi Mendel (Marnis *et al.*, 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi zigositas ikan transgenik dengan menggunakan metode RT-qPCR cukup akurat, sederhana, dan relatif murah. Jumlah kopi transgen pada ikan lele dapat dideteksi secara tepat, namun nampaknya pada penelitian ini identifikasi zigositas ikan lele transgenik F-2 masih mempunyai zigositas yang bersifat heterozigot. Hasil penelitian yang sama dilaporkan oleh (Ji *et al.*, 2005) bahwa metode RT-qPCR sangat akurat dan mudah diaplikasikan untuk ikan zebra transgenik.

KESIMPULAN

Zigositas pada ikan lele transgenik F-2 dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode RT-qPCR. Semua ikan transgenik F-2 yang dianalisis adalah heterozigot dengan nilai berkisar 0,80-0,99. Hasil identifikasi zigositas ikan lele transgenik dengan



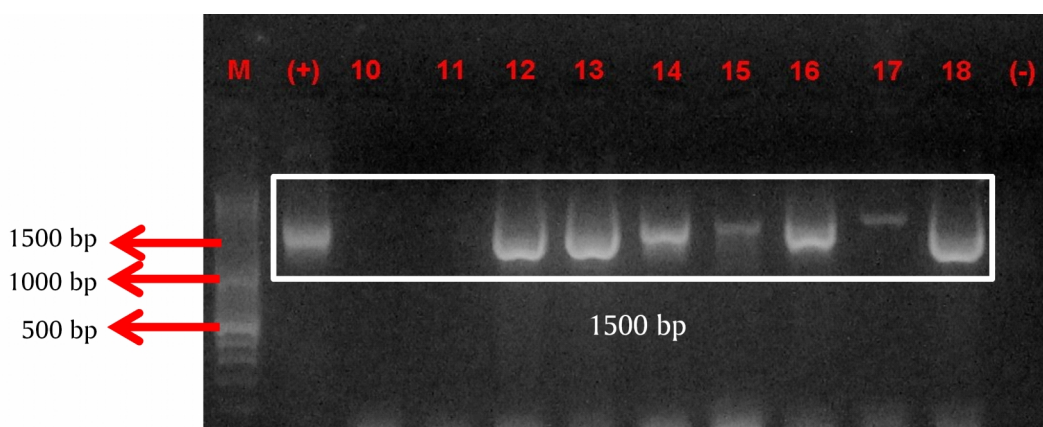
Gambar 2. Identifikasi zigositas pada ikan lele transgenik F-2 dengan metode RT-qPCR (n=14)

Figure 2. Identification zygosity in F-2 transgenic African catfish using RT-qPCR method (n=14)

Tabel 2. Hasil uji progeni induk ikan lele transgenik F-2

Table 2. Result of progeny test F-2 transgenic African catfish broodstock

Transmisi tansgen (%) dari F-2 ke F-3 hasil persilangan betina transgenik F-2 dengan jantan non- transgenik <i>Transmission of transgene (%) from F2 to F3 of transgenic F-2 females crossed with non-transgenic males</i>	Genotipe <i>Genotype</i>	Transmisi tansgen (%) dari F-2 ke F-3 hasil persilangan jantan transgenik F-2 dengan betina non- transgenik <i>Transmission of transgene (%) from F-2 to F-3 of transgenic F-2 males crossed with non-transgenic females</i>	Genotipe <i>Genotype</i>
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
25 (5/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
30 (6/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	15 (3/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
20 (4/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	20 (4/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	40 (8/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	40 (8/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
25 (5/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	20 (4/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	20 (4/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	40 (8/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
5 (1/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	10 (2/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)
15 (3/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)	20 (4/20)	Heterozigot (<i>Heterozygous</i>)



Gambar 3. Deteksi transgen pada beberapa ikan lele transgenik F-3. Nomor 10-18 = individu dari ikan lele transgenik F-3. Tanda (+) adalah kontrol positif (pCcBA-PhGH). Tanda (-) adalah kontrol negatif. M merupakan DNA marker (100-3.000 bp, Vivantis). Ukuran fragmen transgen 1.500 bp

Figure 3. Detection of transgene in several transgenic African catfish F-3. Lane 10-18 = individual number of transgenics African catfish F-3. (+) positive control (pCcBA-PhGH). (-) negative control. M indicates a DNA marker (100-3,000 bp; Vivantis). the expected size of PhGH gene the amplified fragment is 1,500 bp

metode RT-qPCR menunjukkan hasil yang sama dengan uji progeni. Transmisi transgen pada penelitian ini tidak mengikuti hukum segregasi Mendel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN melalui DIPA No. 032.11.2.660052/2014 pada Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI), Sukamandi. Terima kasih disampaikan kepada staf peneliti dan semua teknisi yang terlibat dalam kegiatan penelitian ini, Puji Sumargono, Ilma Lizandri, Maya Febrina Pangestika, dan Didi.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Yoshizaki, G., & Carman, O. (2007). Metode cepat untuk identifikasi zigositasi pada ikan transgenik. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 6(2), 177-182.
- Bubner, B., Gase, K., & Baldwin, I.T. (2004). Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. *BMC Biotechnol*, 4, 14. doi: 10.1186/1472-6750-4-14.
- Devlin, R.H., Biagi, C.A., & Yesaki, T.Y. (2004). Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture*, 236, 607-632.
- Dewi, R.R.S.P.S. (2010). *Studi over-ekspresi gen penyandi hormon pertumbuhan melalui elektroforesis sperma untuk membuat ikan patin siam transgenik cepat tumbuh*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor, Jawa Barat.
- Fletcher, G.L., Hobbs, R.S., Evans, R.P., Shears, M.A., Hahn, A.L., & Hew, C.L. (2011). Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 42, 427-440.
- Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18, 62-63.
- Haurogné, K., Bach, J.M., & Lieubeau, B. (2007). Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Res.*, 16, 127-131.
- Huberman, J.A. (1995). Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm. *Biotechniques*, 18(4), 636.
- Ji, W., Zhou, W., Abruzzese, R., Guo, W., Blake, A., Davis, S., Davis, S., & Polejaeva, I. (2005). A method for determining zygosity of transgenic zebrafish by TaqMan real-time PCR. *Anal. Biochem.*, 344, 240-246.
- Linacero, R., Rueda, J., & Vazquez, A.M. (1998). Quantification of DNA. p. 18-21; *In* Karp, A., Isaac, P.G., & Ingram, D.S. (Eds.), *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman and Hall. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Manchester, K.L. (1995). Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Biotechniques*, 19(2), 208-210.
- Marnis, H., Iswanto, B., Suprpto, R., Imron, & Dewi, R.R.S.P. (2015). Pertumbuhan dan sigositasi ikan lele Afrika (*Clarias gariepinus*) transgenik F-2 yang membawa gen hormone pertumbuhan ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *J. Ris. Akuakultur*, 10(2), 161-168.
- Martinez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernandez, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina, T.C., Abad, Z., Sanchez, V., Melamed, P., Leonart, R., & de la Fuente, J. (1996). Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 62-70.
- Martinez, R., Arenal, A., Estrada, M.P., Herrera, F., Huerta, V., Vázquez, J., Sánchez, T., & de la Fuente, J. (1999). Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture*, 173, 271-283.
- McKnight, R.E., Gleason, A.B., Keyes, J.A., & Sahabi, S. (2006). Binding mode and affinity studies of DNA-binding agents using topoisomerase I DNA unwinding assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(4), 1013-1017. doi:10.1016/j.bmcl.2006.11.038.
- Mitreèiæ, D., Huzak, M., Æurlin, M., & Gajoviæ, S. (2005). An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real-time quantitative PCR assay. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 64, 83-98.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., & Kim, D.S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mudloach (*Misgurnus mizolepis*). *Transgenic Research*, 10, 353-362.
- Nam, Y.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., & Kim, D.S. (2002). Accelerated growth performance and stable germline transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach (*Misgurnus mizolepis*). *Aquaculture*, 209, 257-270.
- Rahman, M.A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., & Maclean, N. (1998). Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research*, 7, 357-369.

- Rahman, M.A., Ronyai, A., Engidaw, B.Z., Jauncey, K., Hwang, G.L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L., & Maclean, N. (2001). Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of Fish Biology*, 59, 62-78.
- Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Watanabe, S., Sato, M., & Shindo, T. (2008). Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Research*, 17, 149-155.
- Schweitzer, C., & Scaiano, J.C. (2003). Selective binding and local photophysics of the fluorescent cyanine dye PicoGreen in double-stranded and single-stranded DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5, 4911-4917. doi:10.1039/b305921a.
- Zhong, C., Song, Y., Wan, Y., Li, Y., Liao, L., Xie, S., Zhu, Z., & Hu, W. (2012). Growth hormone transgene effects on growth performance are inconsistent among offspring derived from different homozygous transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 3, 56-357.