

EFEKTIVITAS METODE TRANSFEKSI DALAM TRANSFER GEN PADA ZIGOT IKAN CUPANG ALAM (*WILD BETTA*), *Betta imbellis*

Anjang Bangun Prasetyo, Ani Kusrini, Ruby Vidia Kusumah,
Sawung Cindelaras, dan Siti Murniasih

Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias
Jl. Perikanan No. 13, Pancoran Mas, Depok 16436
E-mail: azamhafidz@yahoo.co.id

(Naskah diterima: 7 Januari 2013; Disetujui publikasi: 2 April 2013)

ABSTRAK

Transfeksi merupakan salah satu metode transfer gen (transgenesis) yang tepat diaplikasikan pada cupang alam (*wild betta*), *Betta imbellis* dikarenakan pemijahannya yang alami dan sulit untuk dilakukan stimulasi. Penelitian yang terkait dengan upaya peningkatan kualitas warna ikan cupang alam ini bertujuan untuk melihat efektivitas metode transfeksi dalam penyisipan gen asing pada zigot *B. imbellis*. Analisis laboratorium dan proses pemeliharaan ikan dilaksanakan di Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias serta Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, selama 6 bulan. Calon induk *B. imbellis* diseleksi dan dipijahkan dengan perbandingan 1♂ : 1♀, selanjutnya dilakukan transfeksi pada telur yang telah dibuahi, sebagian kecil diambil untuk isolasi DNA dan di-PCR. Gen asing yang digunakan untuk perlakuan adalah *Green Fluorescent Protein* (GFP) 1:1 dan 3:1 serta *Red Fluorescent Protein* (RFP) 1:1 dan 3:1 dengan jumlah ulangan masing-masing sebanyak 6 kali. Sebagai kontrol, ditambahkan juga perlakuan non transfeksi (non transgenik) yaitu tanpa penyisipan gen GFP maupun RFP. Pengamatan dilakukan sejak perkembangan zigot mulai dari penghitungan derajat penetasan (HR) dan sintasan larva (SR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah dilakukan transfeksi tidak memperlihatkan pola yang jelas dari setiap perlakuan, namun secara umum tidak berbeda signifikan dengan kontrol non transgenik. PCR pada embrio dan larva menunjukkan hasil positif di mana DNA teramplifikasi pada ukuran sekitar 0,6 kb untuk beberapa ulangan. Dari hasil yang diperoleh ini dapat ditarik kesimpulan bahwa metode transfeksi efektif digunakan untuk transfer gen ikan cupang alam, *wild betta* (*Betta imbellis*).

KATA KUNCI: *Betta imbellis*, transfer gen, transfeksi

ABSTRACT: *Effectiveness of transfection method on gene transfer in wild Betta (Betta imbellis) zygote. By: Anjang Bangun Prasetyo, Ani Kusrini, Ruby Vidia Kusumah, Sawung Cindelaras, and Siti Murniasih*

Transfection is one of the proper method that was applied to the Betta imbellis because fishes spawn naturally and difficult to stimulate artificially. The research objective was to evaluate the effectiveness of transfection method in trasfering of foreign genes in zygotes B. imbellis. Laboratorium analysis and fishes rearing were conducted at the Research and Depelopment Institute for Ornamental Fish Culture and Research Institute for Freshwater Fish Breeding And Aquaculture, during 6 months.

B. imbellis broodstock was selected and bred in a ratio of 1♂ : 1♀, then performed transfection in the fertilized egg, some eggs was taken for DNA isolation and PCR. Foreign gene for treatment is 1:1 RFP and RFP 3:1, each treatments with 6 replications. Non transfection treatment without foreign gene was added as control. Observations was done during development of the zygote included hatching rate (HR) and survival rate (SR). Our results showed that for Hatching Rate eggs after transfection did not show a clear pattern of each treatment, but generally have showed no significant difference with non-transgenic controls. PCR results in embryos and larvae showed positive DNA after amplified with approximately 0.6 kb in size for several replicates. From these results it can be concluded that transfection methods in embryos and larvae showed effective for gene transfer of wild betta (*Betta imbellis*).

KEYWORDS: wild betta, *Betta imbellis*, gene transfer, transfection

PENDAHULUAN

Ikan cupang alam (*Wild betta*), *Betta imbellis* merupakan salah satu ikan hias yang banyak diminati para hobiis. Ikan ini mempunyai ciri-ciri antara lain warna biru tua dengan sirip ventral yang berwarna merah menyala, warna merah pada bagian belakang sirip anal, dan dua garis berwarna biru atau hijau pada tutup insang (Goldstein, 2001). Namun demikian untuk lebih meningkatkan kualitas, baik warna, pertumbuhan maupun daya tahan terhadap penyakit, masih memerlukan sentuhan teknologi untuk mengembangkannya. Sehingga akan lebih banyak meningkatkan jumlah hobiis baik nasional maupun internasional. Salah satu teknologi yang dapat diaplikasikan yaitu dengan transgenesis.

Teknologi transgenesis merupakan suatu teknologi rekayasa gen dengan mengintroduksi satu atau lebih DNA asing ke organisme uji dengan tujuan untuk memanipulasi genotipnya ke arah yang lebih baik dan selanjutnya dapat ditransmisikan ke keturunannya (Beaumont & Hoare, 2003 dalam Parenrengi, 2010). Aplikasi transgenesis diharapkan dapat memperbaiki karakter-karakter yang berguna bagi akuakultur seperti peningkatan laju pertumbuhan, perbaikan kualitas daging, peningkatan daya tahan ikan terhadap lingkungan yang ekstrim dan penyakit, serta memperbaiki kualitas warna ikan hias (Gong *et al.*, 2003 dalam Parenrengi, 2010). Pada penelitian ini, untuk meningkatkan kualitas warna ikan cupang dilakukan transgenesis dengan menggunakan GFP (*Green Fluorescent Protein*) dan RFP (*Red Fluorescent Protein*).

GFP biasanya digunakan untuk kajian tentang efektivitas promotor dan ekspresi gen

target. GFP merupakan gen yang mengkodekan protein dan memiliki sifat berpendar hijau (Iyengar *et al.*, 1996 dalam Sucipto, 2009). Gen GFP tersebut dapat dengan mudah dideteksi dengan menggunakan mikroskop fluoresens atau melalui analisis ekspresi gen menggunakan teknik RT-PCR. Gen berpendar ini memiliki beberapa kelebihan. GFP umumnya memiliki tingkat toksisitas yang rendah serta dapat diekspresikan sampai level tertinggi pada organisme lain, tanpa mempengaruhi fungsi fisiologisnya. Ketika gen GFP berfusi dengan protein target, GFP akan mempertahankan aktivitas normal dan fluoresensinya sehingga lokasi, pergerakan, dan aktivitas lain dari protein target dapat dideteksi. Selain itu, gen GFP tidak memerlukan substrat tambahan dan kofaktor untuk berpendar (Felts *et al.*, 2001 dalam Parenrengi, 2010).

Selain GFP, gen pemendar lain yang sering digunakan dalam kajian ilmiah adalah RFP. Gen RFP diisolasi dari karang genus *Discosoma* sp. Gen ini sangat potensial untuk dikembangkan pada kajian bioteknologi dan biologi sel. RFP dapat berperan sebagai komplemen maupun substitusi gen pemendar hijau GFP dari ubur-ubur.

Dalam proses transgenesis, selain dengan mikroinjeksi maupun elektroforesis, transfeksi merupakan salah satu metode yang dapat diaplikasikan untuk penyisipan gen dengan bantuan vektor virus (Harrison *et al.*, 1998). Metode ini berbasis pada penggunaan lipid sebagai agen untuk membawa gen asing melewati membran sel (Yamano *et al.*, 2011). Reagen transfeksi memungkinkan terjadinya internalisasi DNA asing ke dalam sel oleh karena itu dapat menjadi alternatif metode dalam transfer gen. Reagen transfeksi adalah polimerkation atau lipid yang dapat

berinteraksi dan berikatan dengan DNA pada permukaannya. Interaksi tersebut memungkinkan terbentuknya kompleks spherical (poliplex dan lipoplex) yang dapat berikatan dengan membran sel target sehingga DNA asing dapat terinternalisasi melalui endositosis dan tidak terdegradasi oleh reaksi enzimatik di dalam sel. Reagen transfeksi memiliki cara kerja yang unik saat memasukkan DNA asing ke dalam sel dengan risiko kerusakan fisik yang lebih kecil pada organisme target. Dengan meminimalisasi kerusakan tersebut, diharapkan derajat penetasan (HR) pada organisme transgenik akan meningkat. Selain itu menurut Felgner *et al.* (1987), pengembangan metode transfeksi berbasis lipid dapat meningkatkan efisiensi transfer gen dan tidak bersifat toksik pada sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transfeksi adalah metode yang paling efektif untuk memproduksi udang transgenik jika dibandingkan dengan mikroinjeksi maupun elektroforesis (Sun *et al.*, 2004 dalam Calderon, 2004).

Pelitan ini bertujuan untuk melihat efektivitas metode transfeksi dalam penyisipan gen asing pada zigot ikan cupang alam *B. imbellis*.

BAHAN DAN METODE

Gen warna yang dicobakan adalah GFP dan RFP yang telah diintroduksi ke Indonesia. Konstruksi DNA yang digunakan berbentuk plasmid yang dikontrol oleh promoter $\hat{\alpha}$ -aktin dari ikan medaka dengan panjang fragmen 0,6 kb untuk pmBA GFP (Takagi *et al.*, 1994) dan 4 kb untuk dsRed-N1 (Clontech).

Beberapa pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain pematangan gonad induk, koleksi telur, transfeksi zigot, derajat penetasan, sintasan, dan deteksi ekspresi gen pendar serta perkembangan embrio.

Pematangan Gonad Induk

Induk jantan maupun betina yang akan dipijahkan diseleksi terlebih dahulu. Kriteria seleksi didasarkan pada kondisi fisik ikan yang sehat yaitu pergerakannya aktif, tidak terserang penyakit, warnanya menarik, dan perutnya terlihat membesar sebagai tanda ikan telah mulai matang gonad. Ikan dipelihara di akuarium dengan pemberian pakan secara *ad satiation* (sampai ikan kenyang). Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari, yaitu pada pagi

dan sore hari. Pakan yang diberikan berupa *bloodworm* yang telah diperkaya dengan vitamin E. Sebanyak 100 g *bloodworm* ditambahkan dengan 0.240 g serbuk vitamin E dan dua kapsul natur-E. Pengkayaan pakan dilakukan untuk mempercepat pematangan gonad.

Koleksi Telur

Induk jantan dan betina yang telah matang gonad dipijahkan dengan perbandingan 1:1 dalam akuarium ukuran 20x15x15 m³ dengan ketinggian air \pm 14 cm. Telur yang telah dibuahi dikoleksi ke dalam cawan petri kemudian dicuci dengan larutan fisiologis (NaCl 0,9%) dan dilanjutkan pencucian dengan akuades. Dalam penelitian ini ada empat perlakuan pada penelitian ini dengan enam ulangan pada setiap perlakuannya. Disiapkan pula tiga ulangan untuk kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Jumlah telur yang digunakan pada masing-masing ulangan berjumlah 50 butir. Setelah dilakukan pencucian, telur yang akan diberi perlakuan dimasukkan ke dalam *tube* 2 mL berisi 0,5 mL air.

Transfeksi Telur

Transfeksi telur dilakukan pada embriofase 2-64 sel. Langkah pertama yang dilakukan adalah penyiapan larutan transfeksi. Dibuat campuran DNA plasmid pada media NACl 0.9% hingga mencapai konsentrasi akhir 0,01 μ g/ μ L (1 μ g plasmid dalam 100 μ L media), sebanyak 100 μ L campuran tersebut dimasukkan ke dalam *tube* 2 mL dan diberi label sesuai perlakuan, yaitu GFP 1:1, GFP 3:1, RFP 1:1, dan RFP 3:1. Ditambahkan 1 μ L reagen ke *tube* berlabel 1:1 dan 3 μ L reagen pada *tube* dengan label 3:1 kemudian campuran reagen:DNA tersebut diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *tube* yang berisi telur perlakuan dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Embrio yang telah diberi perlakuan kemudian dipindah dalam wadah inkubasi sampai menetas. Penggantian air pada wadah pemeliharaan dilakukan tiap 12 jam sekali.

Derajat Penetasan

Derajat Penetasan adalah persentase jumlah larva yang menetas dibagi dengan jumlah keseluruhan telur yang diberi perlakuan dalam satu ulangan. Penghitungan HR dilakukan untuk mengetahui pengaruh

perlakuan terhadap persentase penetasan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Secara ringkas, derajat penetasan dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Derajat penetasan} = \frac{\text{Jumlah telur menetas}}{\text{Jumlah telur dibuahi}} \times 100$$

Sintasan

Selain derajat penetasan, dilakukan juga penghitungan sintasan larva hasil transgenik selama penelitian berlangsung.

Deteksi Ekspresi Gen Pemendar

Deteksi ekspresi gen pemendar dengan PCR dilakukan dua kali, yaitu pada telur saat fase embrio akhir dan pada larva. Sebelum PCR, dilakukan ekstraksi DNA terlebih dahulu menggunakan kit Puregene (Qiagen) sesuai protokol manual pada kit tersebut. Hasil ekstraksi kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan voltase 65 V, kecepatan 400 mV, selama 30-40 menit. DNA yang diperoleh selanjutnya di PCR dengan primer GFP-r: 5'-ACG AAC TCC AGC AT-3' dan GFP-f: 5'-GGT CGA GCT GGA CGG CGA CG-3' untuk sampel dengan perlakuan menggunakan GFP. Sampel dengan perlakuan RFP diamplifikasi menggunakan primer dsRed-F: 5' ATG GCC TCC GAG AAC GTC 3' dan dsRed-R: 5' GTC CAG CTT GGC GTC CAC GTA 3' (Purwanti, 2007). Komposisi PCR untuk masing-masing sampel adalah 12,5 µL master mix, 0,5 µL primer F, 0,5 µL primer R, dan 9 µL *nuclease free water*. Setelah dihomogenasi, ditambahkan 2.5 µL DNA template ke dalam *microtube*. Predenaturasi dilakukan pada 95°C selama 4 menit sebanyak 1 siklus. Denaturasi dilakukan

pada 94°C selama 30 detik. Proses *annealing* dilakukan pada suhu 62°C selama 30 detik. Tahap ekstensi awal dilakukan pada suhu 72°C selama menit, selanjutnya ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Denaturasi, *annealing*, dan ekstensi awal dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1,5% pada voltase 65V selama 60 menit dan didokumentasikan dengan Gel Doc UV *Transilluminator*.

HASIL DAN BAHASAN

Derajat Penetasan

Pada Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa derajat penetasan pasca transfeksi untuk keseluruhan perlakuan baik GFP maupun RFP menunjukkan persentase yang berbeda-beda. Hal ini diduga telur yang digunakan dalam perlakuan berasal dari induk yang berbeda, sehingga dimungkinkan mempunyai kualitas telur yang berbeda pula. Sedangkan untuk kontrol pada beberapa ulangan, telur tidak menetas. Hal ini diduga juga adanya kualitas telur yang dihasilkan kurang bagus.

Rata-rata persentase derajat penetasan pasca transfeksi untuk gen RFP lebih tinggi jika dibandingkan dengan menggunakan gen GFP, hal ini disebabkan karena gen RFP mempunyai sifat yang stabil terhadap lingkungan, sehingga telur pasca transfeksi dapat menetas dengan baik. Hal ini sesuai dengan pendapat Baird *et al.* (2000), Gross *et al.* (2000), Campbell *et al.* (2002) bahwa gen RFP mempunyai sifat stabil pada perubahan pH yang ekstrim, denaturasi, dan *photobleaching* dibandingkan dengan gen GFP. Namun demikian transfer gen GFP dan RFP telah banyak digunakan untuk menghasilkan

Tabel 1. Derajat penetasan telur cupang alam (*Betta imbelis*) pasca transfeksi (%)

Table 1. Hatching rate of *Betta sp. zygotes* after transfection (%)

Perlakuan Treatments	Derajat penetasan telur Hatching rate (%)						Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Ulangan 6	
GFP 1:1	16	2	30	20	52	36	26.00
GFP 3:1	26	4	18	36	56	60	33.33
RFP 1:1	70	50	84	76	64	88	72.00
RFP 3:1	88	68	36	56	100	74	70.33
Kontrol	80	72	-	-	-	-	76.00

ikan hias yang lebih menarik, contoh ikan zebra berwarna-warni yang dapat dilihat pada kondisi cahaya biasa (Gong *et al.*, 2003 dalam Parenrengi, 2010).

Rendahnya persentase derajat penetasan pasca transfeksi untuk gen GFP diduga selain adanya perbedaan kualitas serta kandungan asam amino dan asam lemak yang terkandung pada telur, juga disebabkan oleh faktor luar seperti temperatur. Menurut Kusriani *et al.* (2010), bahwa kandungan asam amino dan asam lemak, terutama asam linoleat mempunyai peran dalam pembentukan vitelogenin dari sel telur. Selanjutnya menurut Woynarivich dalam Yustina & Damawati (2002), bahwa besar kecilnya daya tetas dipengaruhi oleh makan, ukuran ikan dan kondisi lingkungan. Kondisi suhu ruang pendederan pada saat penelitian kurang kondusif sampai 35°C sehingga terjadi perubahan yang sangat ekstrim. Hal ini juga diduga sebagai faktor penyebab yang mempengaruhi daya tetas telur. Hal yang sama dikemukakan oleh Effendi (1991), bahwa peningkatan suhu dan tekanan oksigen dapat mempengaruhi daya tetas, sedang suhu air dapat mempengaruhi efisiensi perubahan kuning telur menjadi bobot badan embrio ikan

pada proses perkembangan. Telur ikan *Betta splendens* tergolong berukuran sedang, suhu optimal untuk penetasan berkisar antara 26°C sampai 28°C, dengan waktu penetasan sekitar 3 sampai 4 hari.

Ekspresi Gen pada Ikan

Ekspresi hasil korporasi DNA ke dalam telur melalui transfeksi pada *Betta imbellis* dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 3. Keberhasilan transfer gen GFP dan RFP dapat dibuktikan dengan analisis PCR. Hasil dari PCR embrio dan larva menunjukkan semua positif membawa gen GFP dan RFP. Hal ini memberikan hasil positif sebanyak 45% untuk semua perlakuan maupun ulangan. Pengecekan ekspresi berikutnya dilakukan setelah ikan berumur sekitar 3 minggu (dapat dipotong siripnya). Individu yang positif tersebut selanjutnya akan dilakukan analisis RNA untuk mengetahui ekspresi GFP dan RFP pada gonad setelah ikan dewasa.

Hasil PCR pada telur dan larva menunjukkan bahwa tingkat keberhasilan yang optimal ditunjukkan pada transfeksi GFP, sedangkan transfeksi RFP pada telur dan larva belum memperlihatkan hasil yang optimal (gen

Tabel 2. Hasil PCR pada telur dan larva ikan cupang setelah perlakuan
Table 2. PCR result in zygotes and larvae after treatments

Kode Code	Perlakuan Treatment	PCR	Kode Code	Perlakuan Treatment	PCR
A1	GFP 1:1 (1)	+	1A	RFP 1:1 (1)	+
B1	GFP 1:1 (2)	+	2A	RFP 1:1 (2)	-
C1	GFP 1:1 (3)	+	3A	RFP 1:1 (3)	-
D1	GFP 1:1 (4)	+	4A	RFP 1:1 (4)	+
E1	GFP 1:1 (5)	+	5A	RFP 1:1 (5)	-
F1	GFP 1:1 (6)	+	6A	RFP 1:1 (6)	+
A2	GFP 3:1 (1)	+	1B	RFP 3:1 (1)	-
B2	GFP 3:1 (2)	+	2B	RFP 3:1 (2)	-
C2	GFP 3:1 (3)	+	3B	RFP 3:1 (3)	-
D2	GFP 3:1 (4)	+	4B	RFP 3:1 (4)	+
E2	GFP 3:1 (5)	+	5B	RFP 3:1 (5)	-
F2	GFP 3:1 (6)	+	6B	RFP 3:1 (6)	+

Keterangan:

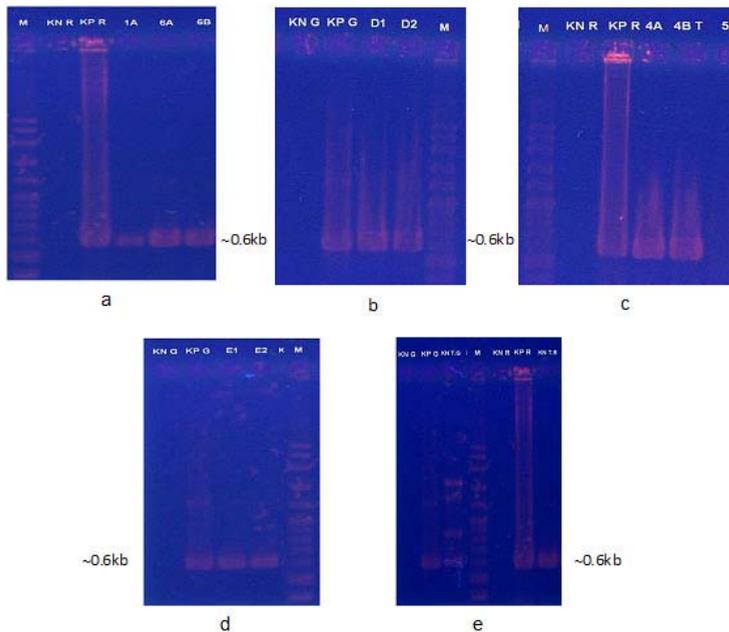
(+) : gen terdeteksi

(-) : gen tidak terdeteksi

terdeteksi hanya pada beberapa perlakuan). Hal ini sesuai pendapat Purwanti (2007), bahwa tingkat keberhasilan dan ekspresi GFP pada ikan mas *Cyprinus carpio* dan ikan lele diperoleh hasil yang tinggi.

Berdasarkan hasil PCR pada telur dan larva menunjukkan bahwa pada semua perlakuan dan ulangan dengan GFP baik 1:1 maupun 3:1 menunjukkan (+) atau gen berhasil terdeteksi (Tabel 2), Sedangkan untuk perlakuan RFP 1:1, gen berhasil terdeteksi hanya pada 3 ulangan, dan terdeteksi juga pada 2 ulangan untuk gen RFP 3:1. Hal ini juga dapat dibuktikan dengan munculnya pita (*band*) hasil elektroforesis yaitu pada ukuran pita DNA sekitar 0,6 kb yang ditemukan pada telur dan embrio (Gambar 1) dan larva (Gambar 2).

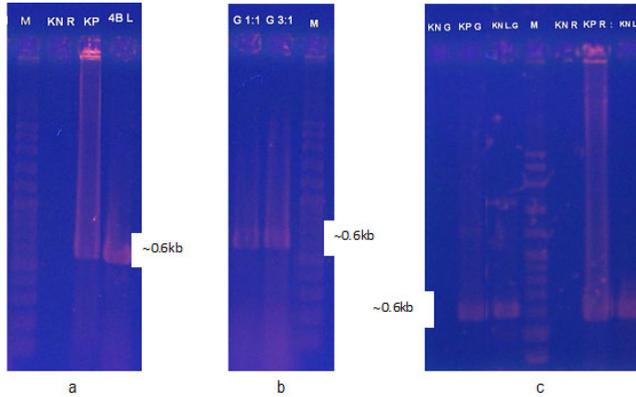
Kelompok non transgenik pun dapat teramplifikasi dengan ukuran DNA yang sama. Menurut Sambrook & Russel (2001), munculnya pita DNA pada kontrol non transgenik dapat disebabkan karena peralatan yang digunakan dengan template DNA. Seharusnya konstruksi plasmid didesain dari ikan cupang alam sendiri (*all fish gene construct*), sehingga akan diperoleh primer yang spesifik, seperti yang dilakukan Parenrengi (2010) dengan menggunakan *all-shrimp gene construct* untuk transgenesis pada udang windu. Namun demikian hal ini membutuhkan waktu yang cukup lama dan tidak mungkin dilakukan dalam penelitian ini. Untuk melihat spesifik atau tidaknya primer yang digunakan, maka dilakukan PCR pada sirip induk *B. Imbellis* dan pada genom ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Gambar 3).



keterangan: M= marker 100 bp DNA ladder, KN G= kontrol negatif GFP, KN R= kontrol negatif RFP, KP G=kontrol positif GFP, KP R= kontrol positif RFP, KN TG= embrio non transgenik untuk kontrol GFP, KN TR= embrio non transgenik untuk kontrol RFP)

note:-M= 100 bp DNA ladder, KN G= negative control of GFP, KN R= negative control of RFP, KP G= positive control of GFP, KP R= positive control of RFP, KN TG= negative control of GFP from non transgenic group, KN TR= negative control of RFP from non transgenic group)

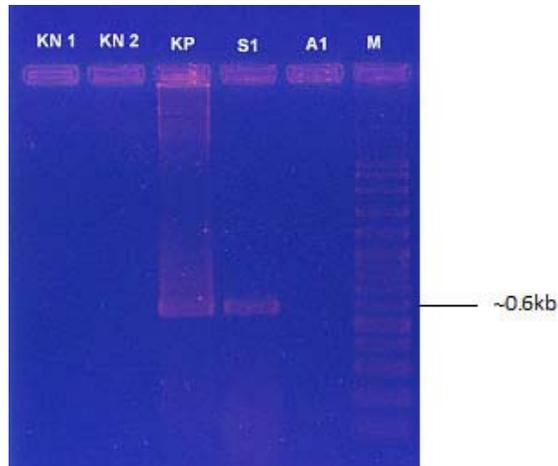
Gambar 1. Hasil PCR telur dan embrio *Betta* sp.
Figure 1. PCR of eggs and embryo results



keterangan: M= marker 100 bpDNA ladder, KN G=kontrol negatif GFP, KN R= kontrol negatif RFP, KP G=kontrol positif GFP, KP R=kontrol positif RFP, KN LG=larva non transgenik untuk kontrol GFP, KN LR=larva non transgenik untuk kontrol RFP)

note: M= 100 bp DNA ladder, KN G= negative control of GFP, KN R= negative control of RFP, KP G= positive control of GFP, KP R= positive control of RFP, KN LG= negative control for GFP from larvae of non transgenic group, KN LR= negative control for RFP from larvae of non transgenic group)

Gambar 2. Hasil PCR larva *Betta imbellis*
Figure 2. PCR of larvae *Betta imbellis* results



keterangan: M= 100 bp DNA ladder, KN=kontrol negatif, KP=kontrol positif, S1=sirip *B. imbellis*, A1=genom *C. carpio*.

note: M= 100 bp DNA ladder, KN1 & KN 2= negative control, KP= positive control, S1= broodstock's fin of *Betta sp.*, A1= genom of *C. carpio*.

Gambar 4. Hasil PCR pada gel agarose 1.5%
Figure 4. PCR results in 1.5% agarose gel

Tabel 3. Jumlah sintasan hasil penyisipan gen warna RFP dan GFP
 Table 3. Survival Rate resulted form introduced RFP gen and GFP

Perlakuan <i>Treatments</i>	Sintasan <i>Survival rate</i>
RFP 1:1	4
RFP 1:1	24
RFP 1:1	30
RFP 3:1	10
RFP 3:1	21
RFP 3:1	6
GFP 1:1	13
GFP 1:1	8
GFP 1:1	17
GFP 3:1	17
GFP 3:1	39
GFP 3:1	3
Kontrol negative	3
Kontrol positif (RFP)	2
Kontrol negatif (GFP)	1

Konfirmasi PCR menunjukkan bahwa pita DNA hanya muncul pada kontrol positif dan sampel sirip, akan tetapi tidak muncul pada tiga sampel lainnya. Dalam hal ini, hasil PCR yang belum konsisten dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Kondisi PCR yang belum optimal juga dapat menyebabkan hal tersebut terjadi. Kontaminasi pada gel agarose atau pada saat elektroforesis adalah faktor lain yang diduga menjadi penyebabnya.

Sintasan Larva

Penghitungan sintasan larva hasil transgenik dilakukan selama pemeliharaan. Namun demikian selama pemeliharaan banyak juga mengalami kematian, demikian juga untuk ikan kontrol sintasan cukup rendah (Tabel 3).

Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa sintasan dari hasil perlakuan yang berbeda pada penyisipan gen RFP dan gen GFP menunjukkan pola yang tidak jelas. Hal ini diduga sintasan yang ada bukan semata-mata pengaruh dari perlakuan, tetapi ada faktor lain selama embriogenesis maupun setelah ikan

menetas, baik dari lingkungan ataupun kualitas telur ikan itu sendiri.

Hasil penelitian menunjukkan adanya mortalitas pada larva. Mortalitas pada larva diduga disebabkan selain habisnya cadangan makanan berupa kuning telur, juga makanan alami yang terdapat di dalam media hidupnya tidak sesuai baik jenis, ukuran maupun jumlahnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil yang diperoleh menunjukan bahwa metode transfeksi dalam penyisipan gen asing pada zigot *B. imbellis* terbukti efektif. Hal ini dapat dibuktikan dengan teramplifikasinya gen GFP dan RFP positif berdasarkan cek PCR. Namun demikian, masih perlu dilakukan uji RT PCR terhadap calon induk FO (untuk meyakinkan keberhasilan gen GFP dan RFP yang ditransfer tersebut dalam gonad, dan nantinya apakah diturunkan pada generasi berikutnya).

Metode transfeksi berpotensi untuk dikembangkan dalam transgenesis karena

reagen yang digunakan dalam penelitian ini tidak bersifat toksik pada individu target. Selain itu, untuk metode transfeksi tersebut lebih mudah untuk diaplikasikan terhadap ikan-ikan hias berukuran kecil, yang pada umumnya sulit dilakukan pemijahan buatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA tahun anggaran 2011 Balai Penelitian Dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias. Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Ikan Hias, Kepala Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi beserta staf peneliti di laboratorium genetik yang telah banyak membantu dalam penelitian ini serta memberikan keleluasaan menggunakan semua fasilitas yang ada. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Alimuddin dan Dwiatmi Narwanti yang banyak membantu kelancaran dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baird, G.S., Zacharias, D.A., & Tsien, R.Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS* 97: 11984-11989.
- Calderon, F.R.O. 2004. Transfection reagent-mediated gene transfer for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [Tesis]. University of Hawaii: Hawaii, 57 hlm.
- Campbell, R.E., Oded T., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., & Tsien, R.Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein, *PNAS* 99: 7877-7882.
- Effendi, M.I. 1991. *Biologi Perikanan*: Jakarta. Yayasan Pustaka Nusantara, p. 48-67.
- Felgner, P.L., Gadek T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., & Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413-7417.
- Goldstein, R.J. 2001. *Bettas: Everything About Purchase, Nutrition, Feeding, and Health Care*. New York: Barron's Educational services, Inc., 112 hlm.
- Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K., & Tsien, R.Y. 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS*, 11990-11995.
- Harrison, R.L., Byrne, B.J., & Tung, L. 1998. Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Letters*, 435: 1-5.
- Kusrini, E., Sudarto, Prasetyo, A.B., Kusumah, R.V., & Cindelaras, S. 2010. Keragaan Hasil Persilangan Ikan Cupang Hias *Betta splendens* Sebagai Studi Pendahuluan Program Pemuliaan Ikan Hias. (un-published), 15 hlm.
- Nagy, A., Bercesenyi, M., & Csenyi, V. 1981. Sex Reversal In Corp *Cyprinus carpio* by Oral administration of mettytestoterone. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Science*, 38: 725-728.
- Parentrengi, A. 2010. *Peningkatan resistensi udang windu Penaeus monodon terhadap penyakit White Spot Syndrome Virus melalui transfer gen Penaeus monodon antiviral* [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor: Bogor, 98 hlm.
- Purwanti, L.I. 2007. *Uji aktivitas promotor beta-Actin ikan medaka (Oryzias latipes) pada ikan mas (Cyprinus carpio)* (Skripsi). Bogor. Fakultas Perikanan dan Kelautan, Intitut Pertanian Bogor, 43 hlm.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 3rded. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2,344 pp.
- Syandri, H. 1996. *Aspek reproduksi Ikan bilih Mystacolecsus padangensis*. Disertasi Program Pasca Sarjana Fakultas Perikanan. Bogor: Institut pertanian Bogor, 137 hlm.
- Sucipto, A. 2009. Efektivitas promotor keratin, *Heat shock*, dan α -aktin pada transgenesis ikan nila (*Oreochromis niloticus*), 49 hlm.
- Yamano, S., et al. 2011. Modified Tat peptide with cationic lipid enhances gene transfection efficiency via temperature-dependent and caveolae-mediated endocytosis. *Journal of Controlled Release*, 152: 278-285.