

## EFEKTIVITAS TRANSFER DAN ANALISIS EKSPRESI GEN IMUNOGENIK TAHAN KOI HERPES VIRUS (KHV) PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Khairul Syahputra, Didik Ariyanto, Erma Primanita Hayuningtyas, dan Lamanto

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan  
Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang 41263  
E-mail: [khairul\\_syahputra@yahoo.com](mailto:khairul_syahputra@yahoo.com)

(Naskah diterima: 7 Januari 2013; Disetujui publikasi: 6 Januari 2014)

### ABSTRAK

Penelitian transfer gen imunogenik tahan KHV (krt-GP11) pada ikan mas telah dilakukan dengan metode elektroporasi sperma menggunakan konsentrasi DNA yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi DNA optimal yang efektif digunakan dalam transfer gen pada ikan mas. Sperma dielektroporasi menggunakan tipe kejutan *square wave* dengan voltase 50 V dan jumlah kejutan tiga kali. Konsentrasi DNA yang digunakan adalah 10 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL. Deteksi transgen pada sperma, embrio, dan larva dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk gen krt-GP11. Ekspresi transgen pada embrio dan larva dianalisis secara semi-kuantitatif dengan metode *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen krt-GP11 terdeteksi pada sperma, embrio, dan larva. Pemberian konsentrasi DNA 10 µg/mL lebih efektif digunakan dalam transfer gen krt-GP11 pada ikan mas, sedangkan peningkatan konsentrasi DNA yang digunakan tidak memberikan hasil yang berbeda terhadap keberhasilan transfer gen pada ikan mas. Ekspresi gen krt-GP11 yang berhasil diintroduksi pada ikan mas baru dapat teramati dengan baik pada fase embrio.

**KATA KUNCI:** ikan mas, KHV, elektroporasi, konsentrasi DNA, transfer gen, ekspresi gen

**ABSTRACT:** *Effectiveness of transfer and expression of immunogenic koi herpesvirus (KHV) resistance gene in common carp (Cyprinus carpio). By: Khairul Syahputra, Didik Ariyanto, Erma Primanita Hayuningtyas, and Lamanto*

*The study of gene transfer of immunogenic KHV resistance (krt-GP11) gene was performed by electroporation sperm with several DNA concentrations. The aim of this study was to determine the optimal DNA concentration that was effective for gene transfer in common carp. Sperm electroporation was carried out using a square wave shock at 50 V and 3 pulses. Treatments were DNA concentration of 10 µg/mL, 50 µg/mL, and 100 µg/mL. Transgene detections in sperm, embryo, and larvae were conducted by PCR method using specific primer for krt-GP11 gene. Gene expression in embryo and larvae were analyzed by semi-quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Result showed that krt-GP11 was detected in sperm, embryo, and larvae. DNA concentration of 10 µg/mL was effective for krt-GP11 gene transfer in common carp, while increasing of DNA concentrations level were not significant to the success of gene transfer in common carp. The expression of krt-GP11 gene was observed clearly in embryo stage.*

**KEYWORDS:** *common carp, KHV, electroporation, DNA concentration, gene transfer, gene expression*

## PENDAHULUAN

Pembentukan ikan mas tahan Koi Herpes Virus (KHV) dengan transgenesis merupakan salah satu upaya untuk menanggulangi berkembangnya virus KHV pada ikan mas. Teknologi transgenesis memungkinkan untuk membentuk produk perikanan dengan karakteristik yang diinginkan seperti ikan mas yang tahan KHV. Rekayasa genetik dengan transgenesis dapat digunakan untuk mentransfer gen asing dalam hal ini gen imonogenik tahan KHV pada individu ikan mas secara *in vitro*, sehingga diharapkan akan menghasilkan ikan mas transgenik yang tahan KHV.

Beberapa teknik yang dapat digunakan untuk transfer gen antara lain mikroinjeksi, elektroporasi, biolistik *viral* vector, dan lipofeksi (Beaumont & Hoare, 2003). Teknik yang biasa digunakan untuk transfer gen pada ikan adalah mikroinjeksi (Ozato *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1990); inkubasi sperma (Khoo *et al.*, 1992); elektroporasi sperma (Walker *et al.*, 1995); dan telur (Powers *et al.*, 1992). Salah satu teknik transfer gen yang banyak digunakan pada ikan saat ini adalah elektroporasi, karena selain mudah teknik ini juga dapat menghasilkan atau memproduksi ikan transgenik secara massal.

Transfer gen pada ikan dengan metode elektroporasi dapat dilakukan pada sperma atau telur. Elektroporasi memanfaatkan serangkaian kejutan listrik pendek untuk memodifikasi membran sel dan memberi peluang pada transgen untuk masuk ke dalam sel (Beaumont & Hoare, 2003; Sarmasik, 2003). Pada elektroporasi sperma, gen diintroduksi pada sperma dan digunakan untuk membuahi sel telur. Sperma berperan sebagai pembawa DNA eksogen untuk ditransfer ke dalam genom ikan melalui pembuahan dengan sel telur. Sel sper-

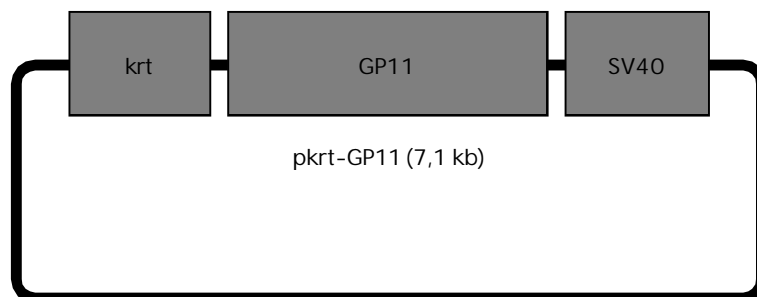
ma telah digunakan sebagai vektor untuk transfer gen pada telur ikan zebra (Khoo *et al.*, 1992); ikan medaka (Ozato *et al.*, 1992); ikan salmon (Sin *et al.*, 1993); dan ikan patin siam (Dewi *et al.*, 2010).

Keberhasilan transfer gen pada ikan salmon (Sin *et al.*, 1993; Symonds *et al.*, 1994) dan ikan patin siam (Dewi, 2010) dengan sperma yang dielektroporasi bergantung pada kuat medan listrik, panjang kejutan, dan konsentrasi DNA yang diberikan. Tingkat keberhasilan transfer gen yang tinggi pada ikan salmon diperoleh dengan pemberian konsentrasi DNA (pRSV-lacZ) yang tinggi (100 µg/mL) (Symonds *et al.*, 1994), sedangkan keberhasilan transfer gen PhGH eksogen pada ikan patin siam yang diintroduksi dengan konsentrasi 10 µg/mL, 50 µg/mL, dan 90 µg/mL, secara berturut-turut adalah 28,57%; 78,57%; dan 85,71% (Dewi, 2010). Berdasarkan beberapa hasil penelitian tersebut, pada penelitian ini dilakukan transfer gen imunogenik tahan KHV (krt-GP11) pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dengan konsentrasi berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi DNA optimal yang efektif digunakan dalam transfer gen pada ikan mas.

## BAHAN DAN METODE

### Konstruksi Gen dan Isolasi Plasmid

Konstruksi gen (plasmid) yang digunakan adalah pkrt-GP11 yang tersusun dari promoter keratin ikan sebelah (Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*) dan gen glikoprotein 11 (GP11), panjang total konstruksi 7,1 kb (Gambar 1) (Alimuddin, 2009; belum dipublikasikan). DNA plasmid diisolasi dengan GeneJET plasmid DNA Purification Kit (Thermo Scientific) dan konsentrasi DNA plasmid diukur dengan GeneQuant™1300.



Gambar 1. Konstruksi pkrt-GP11 (7,1 kb). Sumber: Alimuddin, 2009; belum dipublikasikan  
Figure 1. Construction of pkrt-GP11 (7.1 kb). Source: Alimuddin, 2009; unpublish

### Koleksi Sperma dan Telur

Sperma dan telur dihasilkan dari masing-masing satu ekor induk ikan mas jantan yang berukuran 2 kg dan betina berukuran 4 kg berasal dari Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi. Induk yang telah matang gonad dipilih untuk dipijahkan dan ditempatkan ke dalam bak pemijahan. Induk diinduksi dengan penyuntikan hormon perangsang pemijahan (ovaprim) untuk mendapatkan keseragaman kematangan sperma, telur, dan waktu ovulasi. Pada induk betina, hormon perangsang pemijahan diberikan dengan dosis 0,3 mL/kg bobot; sedangkan pada induk jantan diberikan dengan dosis 0,15 mL/kg bobot. Sel telur dan sperma diperoleh dengan cara *stripping* yang dilakukan 10-12 jam setelah penyuntikan.

### Elektroporasi Sperma

Transfer gen pada sperma ikan mas dilakukan dengan elektroporasi menggunakan mesin *Gene Pulser II* (Biorad, USA). Sperma diencerkan dengan menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,85% (1:1) sebelum dicampur dengan konstruksi gen. Elektroporasi dilakukan dengan tipe kejutan *square wave* dengan panjang kejutan 30 milidetik; interval kejutan 0,1 detik; voltase 50; dan jumlah kejutan tiga kali. Konsentrasi DNA eksogen yang digunakan adalah 10 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL dalam *buffer TE* (Tris-EDTA). Kondisi elektroporasi ini mengacu pada metode elektroporasi pada sperma ikan patin (Dewi *et al.*, 2010) dan pada sperma ikan mas (Syahputra *et al.*, 2011).

### Pengamatan Motilitas

Motilitas sperma hasil elektroporasi diamati dengan mikroskop perbesaran 10x40. Satu

tetes sperma diteteskan di atas gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup. Sperma diaktivasi dengan meneteskan *aquadest* pada tepi gelas penutup. Penilaian pergerakan atau motilitas spermatozoa didasarkan pada kriteria banyaknya sperma yang bergerak maju (progresif) (Tabel 1).

### Ekstraksi DNA Genom pada Sperma, Embrio, dan Larva

Untuk mengetahui keberhasilan transfer gen, dilakukan deteksi transgen pada genom sperma, embrio, dan larva dengan metode PCR. Sebelum dilakukan ekstraksi DNA genom sperma, sperma yang telah dielektroporasi dicuci dengan larutan fisiologis dan diberi perlakuan DNase I. Sebanyak 30 µL sperma dicuci menggunakan larutan NaCl 0,85% dengan cara diresuspensi dan disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm. Pencucian dilakukan sebanyak dua kali. Sperma yang telah dicuci diberi perlakuan 1 µL DNase I (Thermo Scientific) untuk setiap 30 µL sperma. Setelah diberi perlakuan DNase I, sperma dicuci kembali dengan larutan NaCl 0,85% dan kemudian dilakukan ekstraksi DNA genom. DNA genom dari sperma, embrio, dan larva diekstraksi menggunakan GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

### Amplifikasi Gen GP11 dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sebanyak 2 µL DNA genom diamplifikasi dengan menggunakan kit PCR Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific). Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen GP11 adalah F81: 5'-TTA CCG GTA TGG CCT CCA CTT CAA CCG CT-3' dan R81: 5'-TTA AGC GAG CAG TCC CCT CGG GTT CTT-3'

Tabel 1. Kriteria penilaian motilitas sperma

Table 1. Criteria of sperm motility

Kriteria ( <i>Criteria</i> )	Skor ( <i>Score</i> )
> 70% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	5
55%-70% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	4
40%-55% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	3
25%-40% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	2
10%-25% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	1
1%-10% sperma bergerak maju ( <i>Sperm move forward</i> ) ( <i>Progressive</i> )	0.5
Semua sperma tidak bergerak ( <i>All sperms not move</i> ) ( <i>Non-motile</i> )	0

Sumber (*Source*): Dewi *et al.* (2010)

dengan panjang fragmen 1.481 bp. Proses PCR dilakukan dengan program: 95°C selama empat menit; (95°C selama 30 detik; 64°C selama 30 detik; 72°C selama satu menit) sebanyak 40 siklus; dan 72°C selama sepuluh menit. Hasil amplifikasi PCR dicek dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5%. Sebagai kontrol internal digunakan gen  $\beta$ -aktin ikan mas dengan panjang fragmen 300 bp, primer yang digunakan adalah F: 5'-CCCTGGCCCCCAGCACAA TG-3' dan R: 5'-TCTGCGCAGTTGAGTCGG CG-3'.

#### Isolasi RNA total, Sintesis cDNA dan Reverse Transcriptase PCR

RNA total diekstraksi dari embrio dan larva menggunakan TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc.). Kualitas dan kemurnian RNA diukur dengan spektrofotometer Gene-Quant™1300 (GE) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Sebanyak 100 ng–5  $\mu$ g RNA total digunakan untuk mensintesis cDNA menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads* (GE Healthcare) dengan menambahkan oligo (dT) (Roche, Germany) sebagai primer. cDNA diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik untuk gen GP11 dan  $\beta$ -aktin, gen  $\beta$ -aktin digunakan sebagai kontrol jumlah dan kualitas dari cDNA. Produk PCR dielektroforesis pada gel agarose 1,5%.

### HASIL DAN BAHASAN

#### Motilitas, Pembuahan, dan Penetasan

Indeks motilitas sperma ikan mas pada masing-masing perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Peningkatan konsentrasi DNA yang diberikan pada kegiatan elektroporasi tidak me-

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi DNA terhadap motilitas sperma yang dielektroporasi

Table 2. Effect of DNA concentration on the motility of electroporated sperm

Konsentrasi DNA DNA concentration ( $\mu$ g/mL)	Skor motilitas Motility score
Kontrol (Control)	4
10	4
50	4
100	3

mengaruhi secara signifikan terhadap motilitas dari sperma, meskipun terdapat sedikit penurunan motilitas sperma pada perlakuan dengan konsentrasi DNA 100  $\mu$ g/mL. Pemberian konsentrasi DNA 10  $\mu$ g/mL dan 50  $\mu$ g/mL menghasilkan motilitas sperma terbaik dan relatif sama dengan kontrol (Tabel 2). Motilitas sperma yang baik tentunya akan meningkatkan kemampuan sperma dalam membuahi telur dan sebaliknya motilitas sperma yang kurang baik akan menurunkan kemampuan sperma dalam membuahi telur. Motilitas sperma sangat krusial dan penting saat sperma melakukan penetrasi pada membran sel telur dalam proses pembuahan (Ginsburg, 1963).

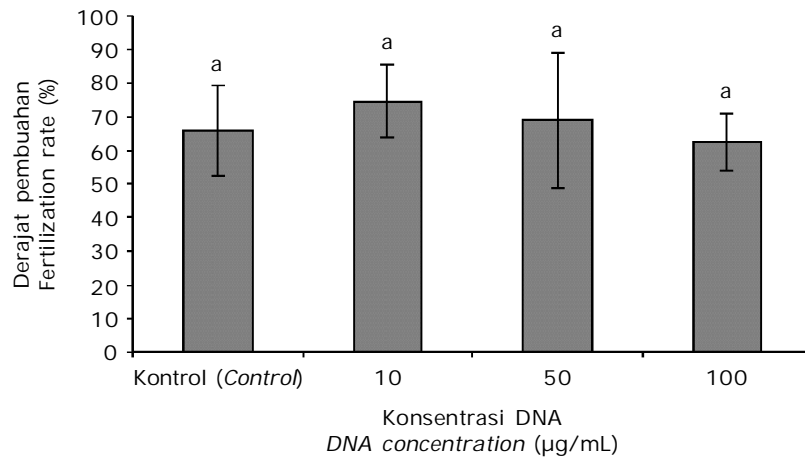
Penurunan motilitas sperma pada proses elektroporasi lebih disebabkan oleh kuat kejutan listrik (voltase) yang diberikan (Sin *et al.*, 1993; Dewi *et al.*, 2010; Syahputra *et al.*, 2011). Elektroporasi yang dilakukan dengan voltase 50 dengan jumlah kejutan tiga kali memberikan persentase motilitas sperma yang tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya (Syahputra *et al.*, 2011), motilitas sperma yang teramati tidak berbeda dengan kontrol.

Selanjutnya sperma yang telah dielektroporasi tersebut digunakan untuk membuahi telur ikan mas yang sudah disiapkan. Hasil fertilisasi telur menggunakan sperma yang dielektroporasi disajikan pada Gambar 2.

Sperma yang dielektroporasi dengan pemberian konsentrasi DNA yang berbeda memiliki kemampuan yang sama untuk membuahi sel telur (Gambar 2). Persentase derajat pembuahan dan laju perkembangan embrio yang teramati relatif sama jika dibandingkan dengan sperma yang tidak diberi perlakuan atau kontrol, persentase derajat pembuahan yang teramati pada penelitian ini juga tidak berbeda dengan penelitian sebelumnya (Syahputra *et al.*, 2011). Derajat pembuahan telur ikan mas pada penelitian ini lebih dipengaruhi oleh perlakuan elektroporasi pada sperma yang digunakan dan faktor biologis seperti kualitas sperma dan telur yang digunakan. Kejutan listrik pada elektroporasi sperma memengaruhi proses fertilisasi telur (Cheng *et al.*, 2002).

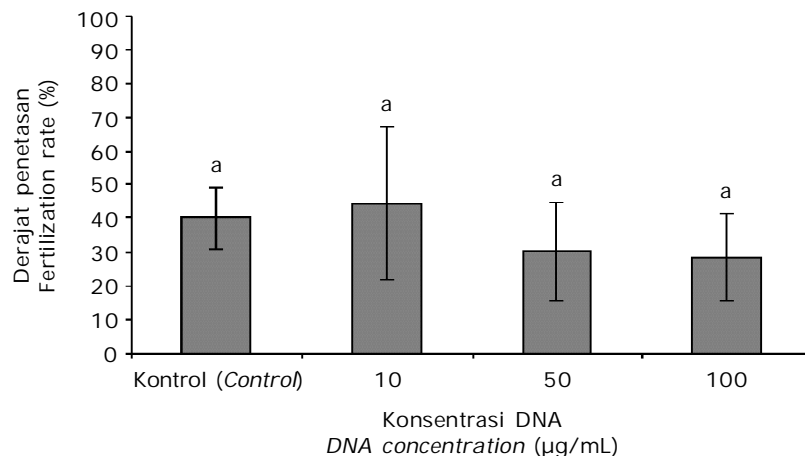
Evaluasi derajat penetasan telur yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi disajikan pada Gambar 3.

Derajat penetasan telur juga menunjukkan hasil yang sama dengan derajat pembuahan, pemberian konsentrasi DNA berbeda pada perlakuan elektroporasi menghasilkan derajat



Gambar 2. Derajat pembuahan (%) telur ikan mas yang dibuahi oleh sperma yang dielektroporasi. Bar merupakan standar deviasi ( $n = 3$ )

Figure 2. Fertilization rate (%) of egg fertilized by electroporated sperm. Bars are standard deviation ( $n = 3$ )



Gambar 3. Derajat penetasan (%) telur ikan mas yang dibuahi oleh sperma yang dielektroporasi. Bar merupakan standar deviasi ( $n = 3$ )

Figure 3. Hatching rate of embryo fertilised by electroporated sperm. Bars are standard deviation ( $n = 3$ )

dan waktu penetasan yang tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kontrol, meskipun terjadi penurunan seiring peningkatan konsentrasi DNA yang diberikan (Gambar 3). Konsentrasi DNA yang diberikan pada elektroporasi sperma memengaruhi terhadap derajat penetasan (Tsai, 2000). Elektroporasi dengan pemberian DNA dengan konsentrasi 10 µg/mL menghasilkan persentase derajat penetasan terbaik (45%) dibandingkan dengan perlakuan

konsentrasi DNA lainnya, sedangkan waktu penetasan terjadi setelah 42 jam dan tidak terdapat perbedaan antara perlakuan dengan kontrol. Derajat penetasan yang lebih tinggi tentunya akan meningkatkan peluang untuk menghasilkan atau memproduksi ikan mas transgenik.

Persentase derajat penetasan telur pada kegiatan elektroporasi dipengaruhi beberapa faktor seperti; kejutan listrik, kualitas sperma,

kualitas telur, dan kelangsungan hidup (sintasan) dari embrio. Kualitas telur yang digunakan dalam pemijahan buatan pada kegiatan elektroporasi menentukan sintasan embrio, dan derajat penetasan (Cheng *et al.*, 2002). Sintasan embrio yang rendah merupakan efek dari penurunan viabilitas dan kemampuan fertilitas dari sperma yang dielektroporasi (Sin *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993).

#### Deteksi Gen GP11 pada Sperma, Embrio, dan Telur

Hasil deteksi gen krt-GP11 yang ditransfer pada sperma yang dielektroporasi, embrio, dan larva ikan mas disajikan pada Gambar 4.

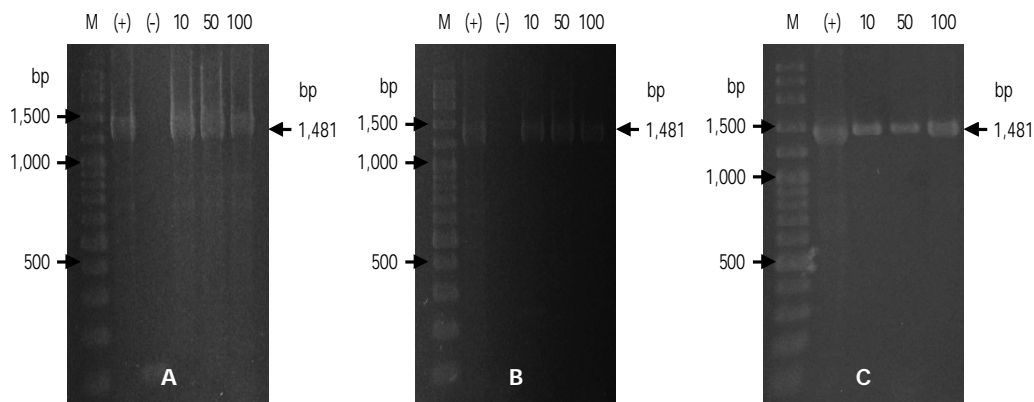
Pada sperma, gen krt-GP11 terdeteksi pada semua perlakuan *level* konsentrasi DNA yang digunakan. Begitu juga pada embrio dan larva hasil pembuahan dari sperma yang dielektroporasi, gen krt-GP11 dapat terdeteksi pada setiap perlakuan yang diberikan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sperma ikan mas dapat digunakan sebagai vektor untuk mentransfer gen yang diinginkan (krt-GP11) pada embrio dan larva melalui pembuahan pada sel telur. Sel sperma juga telah dilaporkan dapat digunakan sebagai vektor untuk transfer gen pada ikan zebra (Khoo *et al.*, 1992); ikan medaka (Ozato *et al.*, 1992); ikan salmon (Sin *et al.*, 1993); ikan loach (Tsai *et al.*, 1995); ikan ayu (Cheng *et al.*, 2002); dan ikan patin siam (Dewi *et al.*, 2010).

Hasil deteksi gen krt-GP11 pada embrio dan larva menunjukkan bahwa peningkatan *level* konsentrasi DNA yang diberikan tidak memberikan hasil yang berbeda terhadap keberhasilan transfer gen pada embrio dan larva ikan mas. Pada elektroporasi sperma, efisiensi transfer gen yang terbaik dapat dicapai dengan pemberian konsentrasi DNA yang kecil menggunakan kejutan listrik yang tinggi (Sin *et al.*, 1993).

#### Ekspresi Gen GP11 pada Embrio dan Larva

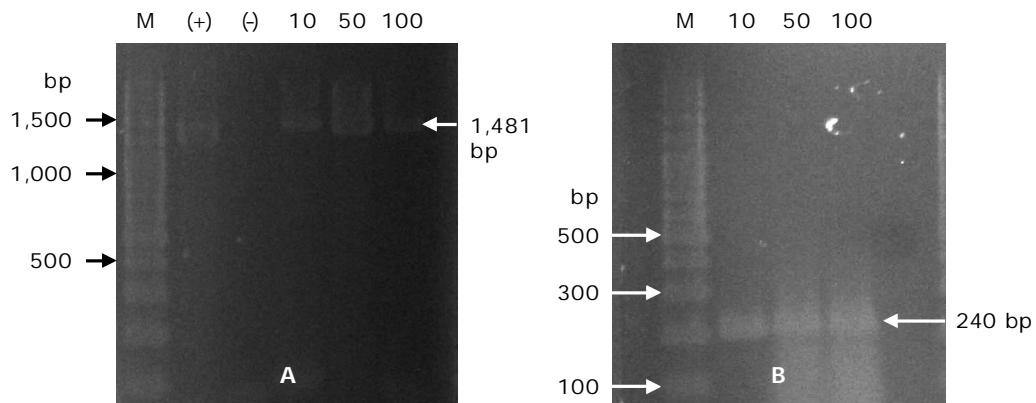
Analisis ekspresi gen GP11 dilakukan pada embrio dan larva yang positif membawa gen krt-GP11. Ekspresi gen GP11 pada embrio dan larva ikan mas dari setiap perlakuan *level* konsentrasi DNA disajikan pada Gambar 5 dan 6.

Hasil analisis ini menunjukkan bahwa promoter keratin ikan sebelah (Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*) dapat mengendalikan ekspresi gen GP11 pada embrio ikan mas. Selain dapat diintroduksi ke dalam embrio ikan mas, gen GP11 juga dapat diekspresikan dengan baik. Transgen dapat diekspresikan sangat bergantung pada pemilihan elemen regulator (promoter) yang tepat (Sheela *et al.*, 1998). Konstruksi gen yang membawa promoter fungsional dapat mengekspresikan transgen pada sejumlah individu transgenik (Sarmasik, 2003).



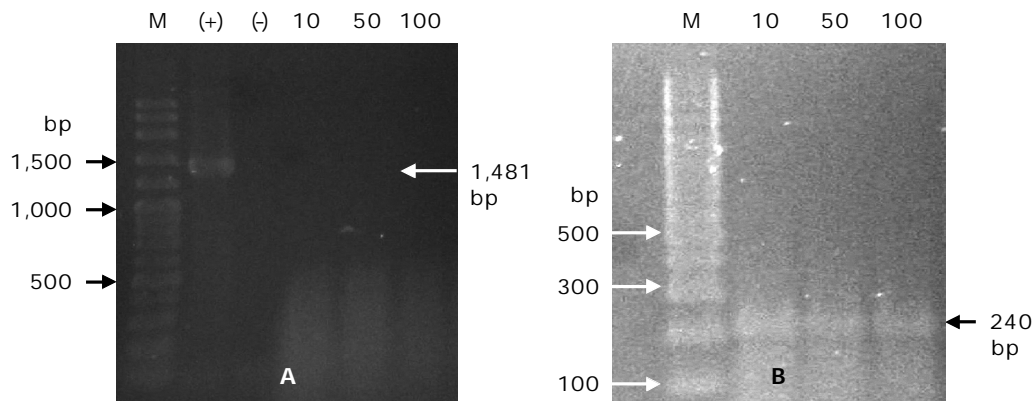
Gambar 4. Deteksi gen krt-GP11 pada sperma yang dielektroporasi (A), embrio (B), dan larva (C). M adalah marker DNA (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis) dan angka 10, 50, 100 menunjukkan konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Panjang fragmen gen krt-GP11 1.481 bp

Figure 4. Detection of krt-GP11 in electroporated sperm (A), embryo (B), and larvae (C). M = DNA Marker ladder (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis) and 10, 50, 100 = DNA concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ). Amplified product of krt-GP11 is 1,481 bp



Gambar 5. Deteksi ekspresi gen GP11 (A) dan  $\beta$ -aktin (B) pada embrio hasil pembuahan dari sperma yang dielektroporasi. M adalah marker DNA (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis), tanda (+) merupakan kontrol positif PCR, tanda (-) merupakan kontrol negatif PCR dan angka 10, 50, 100 menunjukkan konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Panjang fragmen gen krt-GP11 1.481 bp dan  $\beta$ -aktin 240 bp

Figure 5. Detection of krt-GP11 (A) and  $\beta$ -actin (B) expression in embryos fertilised by electroporated sperm. M = DNA Marker ladder (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis), (+) = positive control, (-) = negative control and 10, 50, 100 = DNA concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ). Amplified products of krt-GP11 (1,481 bp) and  $\beta$ -actin (240 bp), respectively



Gambar 6. Deteksi ekspresi gen GP11 (A) dan  $\beta$ -aktin (B) pada larva. M adalah marker DNA (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis), tanda (+) merupakan kontrol positif PCR, tanda (-) merupakan kontrol negatif PCR dan angka 10, 50, 100 menunjukkan konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/mL}$ ). Panjang fragmen gen krt-GP11 1.481 bp dan  $\beta$ -aktin 240 bp

Figure 6. Detection of krt-GP11 (A) and  $\beta$ -actin (B) expression in larvae. M = DNA Marker ladder (VC 100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis), (+) = positive control, (-) = negative control and 10, 50, 100 = DNA concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ). Amplified products of krt-GP11 (1,481 bp) and  $\beta$ -actin (240 bp), respectively

Berbeda dengan embrio, ekspresi gen GP11 tidak terdeteksi pada larva dari setiap perlakuan (Gambar 6). Tidak terdeteksinya ekspresi gen GP11 pada larva dapat disebabkan karena kemungkinan larva yang di-

periksa tidak positif membawa gen GP11. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi ekspresi pada benih yang positif membawa gen GP11 secara individu. Selain itu, juga dapat disebabkan karena gen GP11

yang diintroduksi tidak diekspresikan atau *level* ekspresinya rendah pada fase larva. Seperti yang dilaporkan oleh Dewi (2010), ekspresi gen EGFP yang diintroduksi pada ikan patin siam menurun pada jam ke-30 yaitu pada fase larva. Pola ekspresi gen GP11 pada ikan mas perlu diteliti lebih lanjut pada setiap fase perkembangan ikan mas.

Keberhasilan transfer gen pada penelitian ini membuka peluang untuk menghasilkan ikan mas transgenik *founder* tahan KHV, meskipun masih diperlukan penelitian lanjutan mengenai pola dan kestabilan ekspresi gen GP11 pada tiap fase perkembangan ikan mas. Ikan mas transgenik *founder* yang berhasil dibentuk akan dibesarkan dan dilakukan deteksi transgen pada gamet. Ikan mas transgenik *founder* yang positif membawa transgen pada gamet digunakan untuk memproduksi ikan mas transgenik tahan KHV generasi selanjutnya.

## KESIMPULAN

Konsentrasi DNA 10 µg/mL efektif digunakan dalam transfer gen krt-GP11 pada ikan mas menggunakan metode elektroporasi. Elektroporasi sperma dengan pemberian konsentrasi DNA 10 µg/mL selain memberikan tingkat keberhasilan transfer gen yang tinggi juga menghasilkan persentase derajat pembuahan dan penetasan yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan *level* konsentrasi DNA yang lain. Ekspresi gen krt-GP11 yang berhasil diintroduksi pada ikan mas baru dapat teramati dengan baik pada fase embrio.

## DAFTAR ACUAN

- Beaumont, A.R. & Hoare, K. 2003. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. School of Ocean Sciences University of Wales, Bangor, UK. Blackwell Scienc., 158 pp.
- Cheng, C.A., Liu, K.L., Lau, E.L., Yang, T.Y., Lee, C.Y., Wu, J.L., & Chang, C.Y. 2002. Growth promotion in ayu (*Plecoglossus altivelis*) by gene transfer of the rainbow trout growth hormone gene. *Zoological Studies*, 41(3): 303-310.
- Dewi, R.R.S.P.S., Alimuddin, Sudrajat, A.O., Sumantadinata, K., & Sularto. 2010. Optimal electroporation condition for sperm mediated gene transfer in striped catfish (*Pangasinodon hypophthalmus*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 5(5): 1-10.
- Dewi, R.R.S.P.S. 2010. *Studi over-ekspresi gen penyandi hormon pertumbuhan melalui elektroporasi sperma untuk membuat ikan patin siam transgenik cepat tumbuh*. Disertasi (tidak dipublikasi).
- Ginsburg, A.S. 1963. Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 11: 13-33.
- Khoo, H.W., Ang, L.H., Lim, H.B., & Wong, K.Y. 1992. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture*, 107: 1-19.
- Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y., & Okada, T.S. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken- $\delta$  crystallin gene in medaka embryos. *Cell. Differ.*, 19: 237-244.
- Ozato, K., Wakamatsu, Y., & Inoue, K. 1992. Medaka as model of transgenic fish. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1: 346-354.
- Powers, D.A., Hereford, L., Cole, T., Chen, T.T., Lin, C.M., Knight, K., Creech, K., & Dunham, R. 1992. Electroporation: A method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 301-308.
- Sarmasik, A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of fish. *Turk. J. Zool.*, 27: 1-6.
- Sheela, S.G., Chen, J.D., Mathavan, S., & Pandian, T.J. 1998. Construction, electroporatic transfer and expression of Zp $\beta$ ypGH and Zp $\beta$ rtGH in zebrafish. *J. Biosci.*, 23: 565-576.
- Sin, F.Y.T., Bartlet, A.L., Walker, S.P., Sin, I.L., Symonds, J.E., Hawke, L., & Hopkins, C.L. 1993. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture*, 117: 57-69.
- Syahputra, K., Dewi, R.R.S.P.S., Ariyanto, D., & Hayuningtyas, E.P. 2011. Optimasi kondisi elektroporasi untuk transfer gen pada sperma ikan mas (*Cyprinus Carpio*). *Prosiding Teknologi Akuakultur Indonesia (FITA)*, Bali.
- Symonds, J.E., Walker, S.P., & Sin, F.Y.T. 1994. Electroporation of salmon sperm with plasmid DNA: Evidence of enhanced sperm/DNA association. *Aquaculture*, 119: 313-327.
- Tsai, H.J. 2000. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish



- and shellfish. *Molecular Reproduction and Development*, 56: 281-284.
- Tsai, H.J., Tseng, F.S., & Liao, I.C. 1995. Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Can. J. Fish Aquat Sci.*, 52: 776-787.
- Walker, S.T., Symonds, J.E., Sin, I.L., & Sin, F.Y.T. 1995. Gene transfer by electroporated chinook salmon sperm. *J. Mar. Biotechnol.*, 3: 232-234.
- Xie, Y., Liu, D., Zou, J., Li, G., & Zhu, Z. 1993. Gene transfer via electroporation in fish. *Aquaculture*, 111: 207-213.
- Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalez-Villasenor, L.I., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T., & Powers, D.A. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 3-13.