

EFEKTIVITAS TRANSFER DAN EKSPRESI GEN *PhGH* PADA IKAN PATIN SIAM (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Raden Roro Sri Pudji Sinarni Dewi^{*)}, Alimuddin^{**)},
Agus Oman Sudrajat^{**)}, dan Komar Sumantadinata^{**)}

^{*)} Balai Penelitian Pemuliaan Ikan
Jl. Raya 2 Sukamandi, Subang, Jawa Barat
E-mail: wiewie_thea@yahoo.com

^{**)} Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 16 Februari 2012; Disetujui publikasi: 11 Mei 2012)

ABSTRAK

Penggunaan konsentrasi DNA yang tinggi dalam elektroporasi sperma meningkatkan pengikatan DNA eksogen pada sperma, dan meningkatkan persentase ikan yang membawa gen asing. Pada penelitian ini, konstruksi gen pCcBA-*PhGH* yang mengandung promoter β -aktin ikan mas (pCcBA) dan cDNA hormon pertumbuhan (*PhGH*) ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*) dibuat dan selanjutnya ditransfer menggunakan metode elektroporasi pada sperma yang berperan sebagai perantara. Elektroporasi dilakukan dengan tipe kejutan *square wave* dengan panjang kejutan (*pulse length*) 30 milidetik, interval kejutan (*pulse interval*) 0,1 detik, kuat medan listrik (*electric field strength*) 125 V/cm, dan jumlah kejutan (*pulse number*) 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keberhasilan transfer gen *PhGH* eksogen pada ikan patin siam meningkat dengan meningkatnya konsentrasi DNA yang digunakan. Persentase ikan yang membawa gen asing pada konsentrasi DNA 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, dan 90 $\mu\text{g/mL}$, secara berturut-turut adalah 28,57%; 78,57%; dan 85,71%. Bobot rata-rata yuwana ikan patin siam transgenik F0 umur 2 bulan yang dihasilkan menggunakan konsentrasi DNA 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 90 $\mu\text{g/mL}$ adalah 22,6% dan 19,0% lebih berat dibandingkan non-transgenik, tetapi pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah (-8,45%). Populasi yuwana ikan patin siam berumur 4 bulan yang diintroduksi gen asing dengan konsentrasi 90 $\mu\text{g/mL}$ memiliki bobot rata-rata 53,38% lebih berat dibandingkan kontrol non-transgenik. Dengan menggunakan metode RT-PCR, ekspresi gen *PhGH* terdeteksi pada sirip ikan transgenik, sedangkan pada ikan non-transgenik tidak terdeteksi. Dengan demikian, elektroporasi sperma menggunakan konsentrasi DNA 90 $\mu\text{g/mL}$ efektif meningkatkan keberhasilan transfer gen, dan over-ekspresi gen *PhGH* eksogen meningkatkan pertumbuhan ikan patin siam.

KATA KUNCI: transfer gen, ekspresi gen, pCcBA-*PhGH*, *Pangasianodon hypophthalmus*

ABSTRACT: *PhGH gene transfer effectivity and expression on stripped catfish (Pangasianodon hypophthalmus). By: Raden Roro Sri Pudji Sinarni Dewi, Alimuddin, Agus Oman Sudrajat, and Komar Sumantadinata*

The used of high exogenous DNA concentration in electroporation of sperm enhances the binding of exogenous DNA into sperm, and increase number of fish carrying foreign gene. In this study, pCcBA-PhGH gene construct consists of common carp

β -actin promoter (pCcBA) and striped catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*) growth hormone (PhGH) cDNA was designed and then transferred using electroporation method on sperm that acts as a vector. Electroporation was performed using square-wave type with pulse length 30 milliseconds, pulse interval 0.1 seconds, electric field strength 125 V/cm and pulse number 3 times. The results showed that the success transfer of the exogenous PhGH gene in striped catfish increased by increasing DNA concentration used. Percentage of fish carrying foreign gene in DNA concentration of 10 μ g/mL, 50 μ g/mL and 90 μ g/mL were 28.57%, 78.57%, and 85.71%, respectively. Average body weight of 2 months old transgenic fish juvenile produced by using DNA concentration of 50 μ g/mL and 90 μ g/mL was 22.6% and 19% higher than non-transgenic, but at concentration of 10 μ g/mL was lower (-8.45%). The average weight of 4 months old juvenile produced by using DNA concentration of 90 μ g/mL was 53.38% higher than that of control. By using RT-PCR method, PhGH gene expression was detected in transgenic fish fin tissue, while no expression was observed in non-transgenic fish. Thus, electroporation of sperm with DNA concentration of 90 μ g/mL effectively increased gene transfer efficiency, and over-expression of PhGH exogenous gene enhanced growth of striped catfish.

KEYWORDS: gene transfer, gene expression, pCcBA-PhGH, *Pangasionodon hypophthalmus*

PENDAHULUAN

Hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) merupakan bagian dari hormon yang disirkulasikan untuk menstimulasi pertumbuhan badan. Selain itu GH juga berperan dalam adaptasi ikan di air laut (McLean & Donaldson, 1993) dan menstimulasi steroidogenesis gonad (Rand-Weaver & Kawauchi, 1993). Pada awal produksi ikan transgenik, digunakan gen GH dari manusia atau tikus yang disambungkan dengan promoter metalotionein-1 dari tikus (Zhu *et al.*, 1985; McLean *et al.*, 1987). Pada saat ini berkembang produksi ikan transgenik dengan menggunakan gen GH yang berasal dari ikan (Inoue *et al.*, 1990; Du *et al.*, 1992). Berdasarkan laporan sampai dengan tahun 1991 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).

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 (sekuens heterolog) yang disambungkan dengan promoter metalotionein (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 sebaiknya dihindari, karena sekuens promoter dari spesies yang kekerabatannya jauh kemungkinan tidak dikenali oleh RNA polimerase inang untuk mengarahkan ekspresi gen asing. Namun demikian, hasil observasi selanjutnya menunjukkan bahwa transgen GH yang berasal dari spesies yang kekerabatannya dekat efektif meningkatkan pertumbuhan hewan inang, tetapi jika menggunakan sekuens gen GH homolog yang sama dari spesies yang sama kemungkinan tidak terlalu efektif karena adanya potensi pengaturan umpan balik negatif (Nam *et al.*, 2008). Hasil penelitian Devlin *et al.* (1994) menunjukkan bahwa transfer gen dengan menggunakan konstruksi gen "all-salmonid" yang mengandung gen GH-1 dari salmon *sockeye* (*Oncorhynchus nerka*) yang disambungkan dengan promoter salmon *sockeye* metalotionein-B (MT-B) pada salmon *coho* (*O. kisutch*), yaitu spesies yang kekerabatannya dekat, menyebabkan peningkatan pertumbuhan yang drastis.

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). Hasil penelitian Rahman

et al. (2000) yang mengintroduksi gen reporter *lacZ* dengan promoter β -aktin ikan mas pada ikan nila menunjukkan adanya pola mosaik dari ekspresi *LacZ* pada jaringan somatik berbeda antar garis keturunan, tetapi konsisten dalam satu garis keturunan. Ekspresi gen *LacZ* pada ikan transgenik homozigot sekitar 2 kali lebih besar dibandingkan ikan transgenik heterozigot. Analisis ekspresi gen reporter pada jaringan-jaringan yang didasarkan pada ekspresi gen *LacZ* pada ikan transgenik stabil (*stable transgenic fish*) 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 generasi pertama dan kedua. Ekspresi gen GH eksogen dideteksi pada sejumlah penelitian seperti pada ikan *Northern pike*, *Esox lucius* (Gross *et al.*, 1992) dan ikan mas, *Cyprinus carpio* (Chen *et al.*, 1993). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya bahwa introduksi gen penyandi protein berpendar hijau (*green fluorescent protein*, GFP) dengan menggunakan metode elektroporasi pada sperma efektif dalam memproduksi ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) transgenik. Gen EGFP terbukti mampu tertransfer dan terekspresi baik pada fase embrio maupun larva ikan patin siam (Dewi, 2010). Pada penelitian ini dilakukan introduksi gen *PhGH* ikan patin siam (sekuens homolog) yang disambungkan dengan promoter β -aktin ikan mas (sekuens heterolog) pada ikan patin siam. Teknik transfer gen yang digunakan adalah elektroporasi dengan perantara sperma. Beberapa konsentrasi DNA plasmid digunakan untuk menguji efektivitas transfer gen ke dalam resipien dan ekspresinya pada ikan patin siam. Diharapkan gen *PhGH* eksogen yang diintroduksi selain mampu tertransfer ke dalam resipien juga dapat diekspresikan sehingga dapat mempercepat pertumbuhan ikan patin siam.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Sel Gamet

Induk jantan dan betina yang digunakan adalah induk ikan patin siam berukuran 2-4 kg yang diperoleh dari Balai Penelitian Pemuliaan Ikan di Sukamandi. Induk diseleksi berdasarkan tingkat kematangan gonad. Induk yang telah mencapai TKG III dipilih dari kolam induk untuk dipijahkan di dalam bak pemijahan.

Keseragaman kematangan telur dan ovulasi diinduksi melalui penyuntikan hormon. Induk betina diberi suntikan pertama berupa HCG dengan dosis 500 IU/kg bobot. Suntikan kedua diberikan dengan selang waktu 24 jam berupa ovaprim dengan dosis 0,6 mL/kg bobot. *Stripping* untuk mendapatkan sel telur dilakukan 9-12 jam dari penyuntikan kedua.

Untuk mendapatkan sperma, induk jantan diinduksi melalui penyuntikan hormon ovaprim dengan dosis 0,2-0,3 mL/kg bobot. *Stripping* untuk mendapatkan sperma dilakukan 9-12 jam setelah penyuntikan.

Konstruksi Vektor Ekspresi

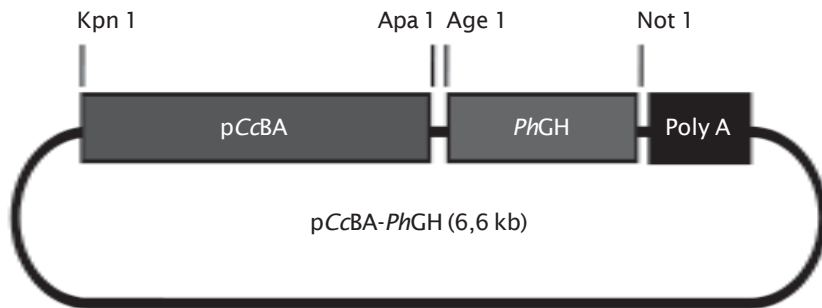
Konstruksi vektor ekspresi gen pCcBA-*PhGH* dimodifikasi dari konstruksi gen pCcBA-*OgGH* yang tersusun atas gen GH ikan gurame (*OgGH*) dan promoter β -aktin ikan mas (pCcBA) (Alimuddin, tidak dipublikasi). Fragmen *OgGH* dibuang dan diganti dengan *PhGH* setelah pCcBA-*OgGH* didigesti menggunakan enzim restriksi *Apal* dan *NotI*. Ligasi fragmen *PhGH* dengan pCcBA dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase (TAKARA). Peta konstruksi gen pCcBA-*PhGH* ditunjukkan pada Gambar 1.

Pengujian Konsentrasi DNA terhadap Keberhasilan Transfer Gen

Pengujian beberapa level konsentrasi pCcBA-*PhGH* dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi terbaik menghasilkan ikan transgenik. Konsentrasi DNA plasmid yang diujikan adalah 10, 50, dan 90 μ g/mL. Transfer gen dilakukan dengan menggunakan metode elektroporasi dengan perantara sperma. Elektroporasi sperma dilakukan menggunakan mesin *Gene Pulser II* (Biorad, USA). Elektroporasi dilakukan dengan tipe kejutan *square wave* dengan panjang kejutan (*pulse length*) 30 milidetik, interval kejutan (*pulse interval*) 0,1 detik, kuat medan listrik (*electric field strength*) 125 V/cm dan jumlah kejutan (*pulse number*) 3 kali (Dewi *et al.*, 2010).

Efektivitas Transfer Gen *PhGH* Eksogen

Keberhasilan transfer gen *PhGH* eksogen diidentifikasi pada yuwana ikan patin siam berumur 2 bulan. Ikan sebanyak 14 ekor dari masing-masing perlakuan dipotong sebagian sirip ekornya untuk kemudian dilakukan ekstraksi DNA genom. Selanjutnya dilakukan



Gambar 1. Peta konstruksi vektor ekspresi gen pCcBA-PhGH (6,6 kb). pCcBA = promotor β -aktin ikan mas. PhGH = gen hormon pertumbuhan ikan patin siam. Poly A = poliadenilasi pada vektor pEGFP-N1. Kpn 1, Apa 1, Age 1, Not 1 = enzim restriksi

Figure 1. Construct map of gene expression vektor pCcBA-PhGH (6.6 kb). pCcBA = common carp β -actin promoter. PhGH = striped catfish growth hormone cDNA. Poly A = polyadenylation at pEGFP-N1 vector. Kpn 1, Apa 1, Age 1, Not 1 = restriction enzyme

proses PCR untuk mendeteksi keberadaan gen PhGH eksogen. Primer yang digunakan adalah F3phGH (5'-TCT TTA GTC AAG GCG CGA CAT TCG AGA- 3') dan R3phGH (5'- CGA TAA GCA CGC CGA TGC CCA TTT TCA-3') (Dewi, 2010). Panjang fragmen PhGH eksogen yang diapit oleh kedua primer tersebut adalah 336 bp. PCR dilakukan dengan program: 94°C selama 3 menit; 94°C selama 30 detik; 62°C selama 30 detik; 72°C selama 1 menit) sebanyak 35 siklus; 72°C selama 3 menit; dan 4°C (tak hingga). Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5%.

Ekspresi Gen PhGH

Ekspresi gen PhGH eksogen diamati dari lima ekor ikan patin siam yang positif membawa gen PhGH eksogen pada sirip ekornya. Sebagian sirip ekor ikan patin siam yang positif membawa gen PhGH eksogen dipotong untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi RNA total. Ekstraksi RNA total menggunakan isogen (Nippon gene). Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads* (GE Healthcare). Ekspresi gen PhGH eksogen dideteksi dengan menggunakan teknik RT-PCR menggunakan primer F3phGH dan R3phGH. Sebagai kontrol internal digunakan gen β -aktin. 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

dipublikasikan). Panjang fragmen β -aktin ikan patin siam yang diapit oleh kedua primer tersebut sekitar 300 bp. PCR dilakukan dengan program: 94°C selama 3 menit; 94°C selama 30 detik; 58°C selama 30 detik; 72°C selama 30 detik) sebanyak 30 siklus; 72°C selama 3 menit; dan 4°C (tak hingga). Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%.

Selain dengan metode RT-PCR, ekspresi gen PhGH eksogen juga dilakukan dengan mengukur bobot ikan patin siam berumur 2 dan 4 bulan. Embrio ikan patin siam yang berasal dari telur yang dibuahi sperma yang dielektroporasi diinkubasi pada suhu 29°C. Telur yang menetas dipelihara selama satu bulan dalam akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm dengan kepadatan 20 ekor per liter. Yuwana ikan patin siam umur 1 bulan dipindahkan ke kolam tanah berukuran 25 m² dengan kepadatan 50 ekor/m² dan dipelihara selama satu bulan. Yuwana umur 2 bulan selanjutnya dipindahkan ke dalam jaring berukuran 3 m x 3 m x 1,5 m dengan kepadatan 40 ekor/m². Selama pemeliharaan ikan diberi pakan secara *ad libitum* dan pada wadah pemeliharaan diberi aerasi. Pengukuran bobot yuwana umur 2 bulan dilakukan pada 14 individu dari masing-masing perlakuan. Selanjutnya dibuat grafik distribusi bobot ikan patin siam yang positif membawa gen PhGH eksogen (transgenik) dan tidak membawa gen PhGH eksogen (non- transgenik) dari masing-masing perlakuan. Pengukuran bobot ikan patin

siam dari masing-masing perlakuan diukur kembali pada yuwana berumur 4 bulan. Pengukuran dilakukan pada 200 ekor yuwana ikan patin siam dari masing-masing perlakuan.

HASIL DAN BAHASAN

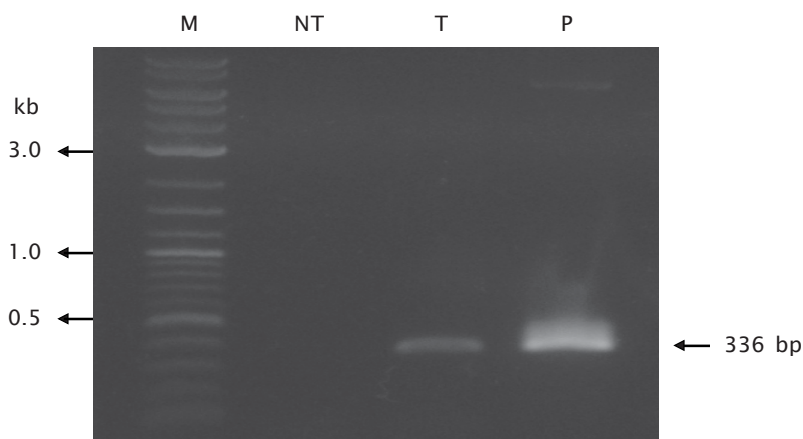
Efektivitas Transfer Gen *PhGH* Ikan Patin Siam

Fragmen gen *PhGH* eksogen produk PCR dengan ukuran 336 bp terdeteksi pada ikan hasil elektroporasi, sedangkan pada ikan kontrol tidak ada (Gambar 2). Hasil analisis DNA menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi DNA plasmid yang digunakan dalam elektroporasi sperma, maka semakin banyak individu transgenik yang diperoleh (Tabel 1). Keberhasilan transfer gen *PhGH* eksogen pada ikan patin siam yang diintroduksi dengan konsentrasi DNA plasmid 10 µg/mL, 50 µg/mL dan 90 µg/mL, secara berturut-turut adalah 28,57%; 78,57%; dan 85,71%. Persentase keberhasilan elektroporasi pada penelitian ini relatif sama dengan yang telah dilaporkan pada ikan salmon, 90% embrio membawa transgen (Walker *et al.*, 1995).

Efisiensi pengikatan DNA eksogen dengan menggunakan elektroporasi pada sperma ikan salmon *chinook* ditentukan oleh kekuatan

medan listrik, jumlah kejutan listrik dan konsentrasi DNA (Symonds *et al.*, 1994). Penelitian pada ikan salmon *chinook* menunjukkan bahwa sperma yang dikejutkan 1 kali dengan konsentrasi DNA 200 µg/mL mampu meningkatkan DNA eksogen yang ditransfer ($20,8 \pm 12,8$), adapun bila dikejutkan 2 kali dengan konsentrasi DNA 20-200 µg/mL tidak mempengaruhi efisiensi transfer gen (Sin *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini, transfer gen pCcBA-*PhGH* dilakukan dengan menggunakan metode elektroporasi pada sperma yang berperan sebagai perantara. Menurut Spadafora (1998), pada proses transfer gen dengan perantara sperma, DNA eksogen terinternalisasi ke dalam nukleus sperma dan selanjutnya terintegrasi ke dalam genom sperma. Gen asing yang terintegrasi akan stabil di sel resipien, sementara dalam bentuk ekstrakromosomal akan terdegradasi oleh *endogenous nuclease*. Menurut Palmiter & Brinster (1986), setelah DNA eksogen mengalami proses degradasi, seringkali DNA eksogen ditemukan dalam kondisi terintegrasi pada kromosom DNA inang. Mekanisme integrasi diduga melibatkan proses penggabungan dan rekombinasi bergantung pada pemotongan kromosom yang bersifat acak.



Gambar 2. Deteksi gen *PhGH* eksogen pada ikan patin siam. Panjang fragmen gen *PhGH* eksogen 336 bp. M adalah marker DNA 0,1-10,0 kb (BioLabs Inc., New England). NT = non-transgenik. T = transgenik. P = kontrol positif berupa plasmid konstruksi gen

Figure 2. Detection of exogenous *PhGH* gene in striped catfish. Fragment size of exogenous *PhGH* gene is 336 bp. M = DNA marker 0.1-10.0 kb (BioLabs Inc., New England). NT = non transgenics. T = transgenic. P = positive control as plasmid of gene construct

Tabel 1. Keberhasilan transfer gen *PhGH* eksogen pada yuwana ikan patin siam pada beberapa tingkat konsentrasi DNA plasmid

Table 1. Effectivity of exogenous *PhGH* gene transfer in striped catfish juvenile at different concentration of plasmid DNA

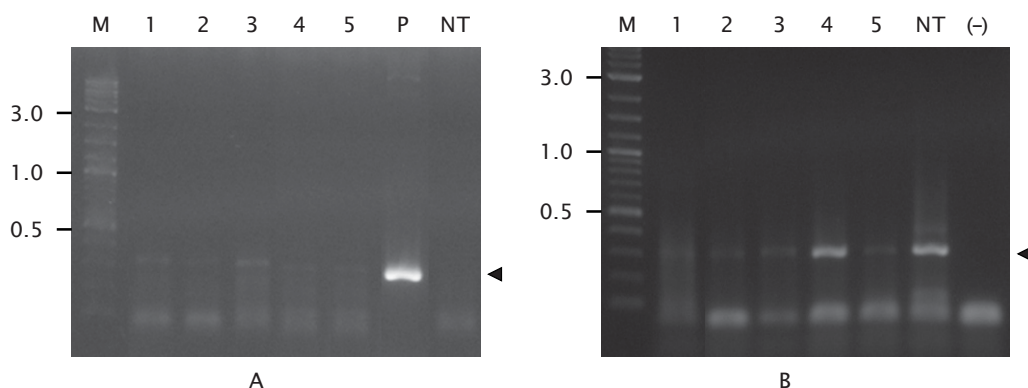
Konsentrasi DNA plasmid <i>Concentration of plasmid DNA (µg/mL)</i>	Jumlah individu yang diperiksa (<i>Number of individuals examined</i>) (ekor/ind.)	Jumlah individu membawa transgen di sirip (<i>Number of individuals carrying the transgen in the fin fish</i>) (%)
10	14	28.57
50	14	78.57
90	14	85.71

Ekspresi Gen pCcBA-*PhGH* pada Yuwana Ikan Patin Siam

Analisis ekspresi gen *PhGH* eksogen pada ikan patin dilakukan pada individu yang positif membawa gen *PhGH* eksogen pada sirip ekornya. Dari lima ekor ikan yang diamati, semuanya menunjukkan bahwa gen *PhGH* terekspresi pada ikan patin siam (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa promoter β -aktin ikan mas mampu mengendalikan ekspresi gen *PhGH* pada ikan patin siam dan telah terjadi over-ekspresi gen *PhGH* pada sirip ikan patin siam. Gen *PhGH* yang ditransfer selain

mampu terinsersi di dalam badan ikan patin siam juga terekspresi dengan baik. Hal ini membuka peluang ditemukannya ikan patin siam transgenik *founder*. Menurut Sarmasik (2003), jika konstruksi transgen membawa promoter fungsional, sejumlah individu transgenik dapat diharapkan untuk mengekspresikan transgen.

Introduksi gen pengkode karakter yang diharapkan ke ikan harus bisa diekspresikan secara akurat dalam ikan resipien. Ekspresi mRNA *PhGH* pada individu transgenik (Gambar 3) menunjukkan bahwa promoter β -aktin ikan



Gambar 3. Ekspresi mRNA *PhGH* eksogen pada sirip individu ikan patin siam transgenik (A) dan mRNA β -aktin ikan patin siam (B) sebagai kontrol *internal*. M adalah marker DNA 0,1-10,0 kbp (BioLabs Inc., New England). Angka 1-5 adalah individu transgenik. P adalah plasmid yang membawa konstruksi gen pCcBA-*PhGH*. NT adalah individu non transgenik. (-) adalah kontrol negatif. Tanda kepala panah menunjukkan keberadaan DNA target

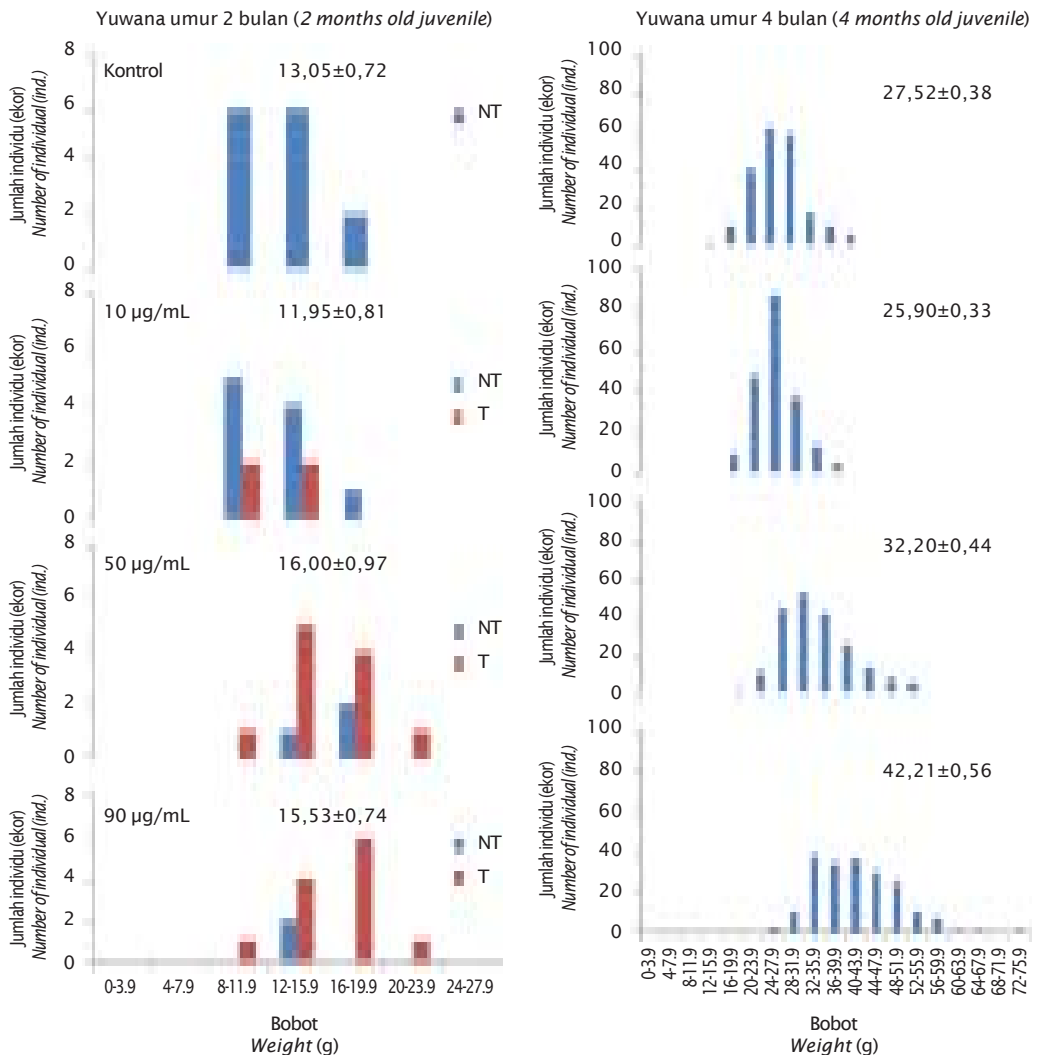
Figure 3. Expression of exogenous *PhGH* mRNA (A) and β -actin mRNA (B) as control internal in caudal fin of transgenic striped catfish. M = DNA marker 0.1-10.0 kb (BioLabs Inc., New England). Number 1-5 are transgenic fish. P = plasmid contain pCcBA-*PhGH*. NT = non transgenic fish. (-) is negative control. Head arrow show target DNA

mas mampu mengendalikan transkripsi gen *PhGH*. Ekspresi transgen yang digabungkan dengan promoter β -aktin pada berbagai jaringan juga ditemukan pada individu transgenik lainnya seperti *mud loach* (Nam *et al.*, 2001) dan ikan nila (Kobayashi *et al.*, 2007).

Transfer gen pCcBA-*PhGH* pada ikan patin siam mampu meningkatkan pertumbuhannya. Pada konsentrasi DNA plasmid 50 $\mu\text{g/mL}$

dan 90 $\mu\text{g/mL}$, individu-individu transgenik cenderung memiliki bobot lebih besar dibandingkan yang non-transgenik. Adapun pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$, bobot individu transgenik cenderung tidak berbeda dengan yang non-transgenik (Gambar 4).

Transkripsi gen asing dapat mulai diamati pada stadia akhir gastrula dan berdasarkan pada analisa radio immuno assay menunjukkan



Gambar 4. Distribusi bobot individu yuwana ikan patin siam hasil introduksi gen pCcBA-*PhGH* dengan konsentrasi plasmid yang berbeda. A = kontrol. B = 10 $\mu\text{g/mL}$. C = 50 $\mu\text{g/mL}$. D = 90 $\mu\text{g/mL}$. NT = non-transgenik. T = transgenik

Figure 4. Distribution of stripped catfish weight, were resulted from pCcBA-*PhGH* gene introduction, at different plasmid concentration. A = control. B = 10 $\mu\text{g/mL}$. C = 50 $\mu\text{g/mL}$. D = 90 $\mu\text{g/mL}$. NT = non transgenic. T = transgenic

bahwa individu yang berbeda memiliki *level* ekspresi yang berbeda (Wu *et al.*, 2003). Menurut Inoue *et al.* (1990), *level* ekspresi transgen bervariasi di antara individu transgenik. Hal ini dikarenakan antara lain karena bervariasinya jumlah transgen yang terintegrasi dan situs integrasi pada individu yang berbeda. Pada penelitian ini, bobot rata-rata yuwana ikan patin siam non-transgenik umur 2 bulan adalah $13,05 \pm 0,72$ g, sedangkan bobot rata-rata yuwana ikan patin siam transgenik yang diintroduksi gen pCcBA-PhGH dengan konsentrasi 10, 50, dan 90 $\mu\text{g/mL}$ secara berturut-turut adalah $11,95 \pm 0,81$ g; $16,00 \pm 0,97$ g; dan $15,53 \pm 0,74$ g. Bobot rata-rata ikan patin siam yang diintroduksi gen pCcBA-PhGH dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 90 $\mu\text{g/mL}$ adalah 22,6% dan 19% lebih berat dibandingkan non-transgenik, tetapi pada dosis 10 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah (-8,45%). Pada yuwana ikan patin siam umur 4 bulan, distribusi bobot ikan pada konsentrasi 50 dan 90 $\mu\text{g/mL}$ semakin bergerak ke arah yang lebih berat. Rataan bobot ikan patin siam pada perlakuan kontrol, 10, 50, dan 90 $\mu\text{g/mL}$ secara berturut-turut adalah $27,52 \pm 0,38$ g; $25,90 \pm 0,33$ g; $32,20 \pm 0,44$ g; dan $42,21 \pm 0,56$ g. Rataan bobot yuwana ikan patin siam umur 4 bulan pada konsentrasi 90 $\mu\text{g/mL}$ lebih berat 53,38% dibandingkan kontrol. Hasil penelitian ini hampir sama seperti yang dilaporkan oleh Zhang *et al.* (1990), yaitu ikan mas transgenik F0 yang membawa konstruksi gen RSVLTR-rtGHc memiliki ukuran badan yang bervariasi dan bersifat mosaik, rata-rata ukuran badannya 22% lebih besar dibandingkan saudara kandungnya yang non-transgenik. Pada ikan *Northern pike* F0 yang diintroduksi konstruksi gen RSVLTR-bGHc dan RSVLTR-csGHc, ekspresi gen GH yang berasal dari sapi dan ikan salmon *chinook* terdeteksi pada serum darah dan mampu menstimulasi pertumbuhan. Rata-rata bobot ikan *Northern pike* transgenik F0 meningkat 30% dengan tingkat mosaik yang tinggi (Gross *et al.*, 1992).

Individu ikan patin siam transgenik F0 memiliki bobot badan yang bervariasi. Beberapa individu transgenik berukuran lebih besar, sebagian lainnya tidak berbeda dan sebagian kecil lainnya lebih kecil dibandingkan yang non-transgenik. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Zhu *et al.* (1985) yang melakukan penelitian pada ikan mas yang ditranfer gen MThGH. Berdasarkan penelitian ini, beberapa individu transgenik menunjukkan peningkatan laju pertumbuhan

yang signifikan, beberapa individu berukuran lebih kecil dibandingkan kontrol dan bahkan beberapa individu menunjukkan morfologi yang abnormal. Hal ini dapat terjadi terkait dengan lokasi integrasi yang mempengaruhi ekspresi dan berfungsinya transgen. Tiga kategori ekspresi berdasarkan lokasi integrasi yaitu: *functional integration*, *silent integration* dan *toxic integration* (Wu *et al.*, 2003).

Respons fenotip dari ekspresi transgen bervariasi di antara individu. Pada yuwana ikan patin siam transgenik, dua individu transgenik memiliki pertumbuhan tercepat yaitu 1,56-1,65 kali dibandingkan rata-rata bobot non-transgenik. Pada ikan *loach* transgenik *founder*, di mana gen (opAFPscGHc) ditransfer dengan menggunakan metode elektroporasi pada sperma, pertumbuhan meningkat sampai dua kali lipat dibandingkan kontrol (Tsai, 2000). Adapun pada ikan ayu (*Plecoglossus altivelis*), elektroporasi konstruksi gen caBA-rtGHc dengan perantara sperma, mampu meningkatkan bobot ikan ayu transgenik *founder* sampai dua kali lipat dibandingkan non-transgenik (Cheng *et al.*, 2002). Transfer konstruksi gen caBA-rtGHc dengan perantara sperma pada ikan *silver sea bream* (*Rhabdosargus sarba*), menunjukkan bahwa beberapa individu transgenik menunjukkan pertumbuhan dua kali lipat lebih tinggi dibandingkan non transgenik (Lu *et al.*, 2002). Transfer konstruksi gen AFP-csGHc pada ikan salmon Atlantik, mampu meningkatkan pertumbuhan 2-6 kali dibandingkan kontrol (Du *et al.*, 1992).

Pada ikan patin siam, transfer gen PhGH yang berasal dari spesies yang sama memberikan ekspresi bervariasi antar individu. Berdasarkan keberhasilan transfer gen PhGH eksogen ke dalam resipien dan efeknya pada pertumbuhan, penggunaan konsentrasi DNA plasmid 90 $\mu\text{g/mL}$ optimal untuk memproduksi ikan patin siam transgenik. Namun demikian masih diperlukan evaluasi lebih lanjut untuk mendapatkan informasi yang lebih lengkap mengenai laju pertumbuhan ikan patin siam dan juga tingkat transmisi transgen pada generasi selanjutnya.

KESIMPULAN

Konsentrasi DNA asing 90 $\mu\text{g/mL}$ terbaik untuk transfer gen pada ikan patin siam. Ikan patin siam transgenik F0 yang tumbuh lebih cepat telah berhasil diproduksi dibandingkan dengan kontrol.

DAFTAR ACUAN

- Chen, T.T., Kight, K.K., Lin, C.M., Powers, D.A., Hayat, M., Chatakondi, N., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., & Dunham R.A. 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 88-95.
- Cheng, C.A., Lu, 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. *Zool. Stud.*, 41(3): 303-310.
- 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.
- 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), 75 pp.
- 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 (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 5: 1-10.
- 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.
- Gross, M.L., Schneider, J.F., Moav, N., Moav, B., Alvarez, C., Myster, S.H., Liu Z., Hallerman, E.M., Hackett, P.B., Guise, K.S., Faras, A.J., & Kapuscinski, A.R. 1992. Molecular analysis and growth evaluation of Northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone genes. *Aquaculture*, 103: 253-273.
- Hackett, P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish, In: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (Eds.), "Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol. 2". Elsevier Science, Amsterdam, p. 207-240.
- Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E., & Fujita, T. 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ Dev.*, 29: 123-128.
- 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.
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., & Chen, T.T. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.*, 4: 328-337.
- McLean, N. & Donaldson, E.M. 1993. The role of somatotropin in growth in poikilotherms. In: Martin P, Scanes CG, Pang PKT (Eds.). The endocrinology of growth, development and metabolism in vertebrates. Academic Press.
- McLean, N., Penman, D., & Zhu, Z. 1987. Introduction of novel genes into fish. *Biotechnology*, 5: 257-261.
- 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. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.*, 20: 465-499.
- 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 metallo-thionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 30: 611-615.
- Rahman, M.A., Hwang, G., Razak, S.A., Sohm, F., & McLean, N. 2000. Copy number dependent transgene expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Trans Res.*, 9: 417-427.
- Rand-Weaver, M. & Kawauchi, H. 1993. Growth hormone, prolactin and somatolactin: a structural overview. In: Hochachka PW, Mommsen TM (Eds.), "Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol. 2". Elsevier Science, Amsterdam, p. 39-56.
- Sarmasik, A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of fish. *Tech. J. Zool.*, 27: 1-6.
- Sin, F.Y.T., Walker, S.P., Symonds, J.E., Mukherjee, U.K., Khoo, J.G.I., & Sin, I.L. 2000. Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene. *Mol. Repro. Dev.*, 56: 285-288.

- Spadafora, C. 1998. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*, 20: 955-964.
- Symonds, J.E., Walker, S.P., & Sin, F.Y.T. 1994. Development of mass gene transfer method in Chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Mol. Mar. Biotechnol.*, 3: 104-111.
- Tsai, H.J. 2000. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. *Mol. Repro. Dev.*, 56: 281-284.
- Walker, S.T., Symonds, J.E., Sin, I.L., & Sin, F.Y.T. 1995. Gene transfer by electroporated Chinook salmon sperm. *J. Mar. Biotech.*, 3: 232-234.
- Wu, G., Sun, Y., & Zhu, Z. 2003. Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat. Living Resour.*, 16: 416-420.
- Zhang, P., Hayat, M, Joyce, C., Gonzalez-Villasenor, L.I., Lin, R.A., Dunham, R.A., Chen, T.T., & Powers, D.A. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRCV-rainbow trout-GHcDNA in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol. Repro. Dev.*, 25: 13-25.
- Zhu, Z., Li, G., He, L., & Chen, S. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *J. Appl. Ichthyol.*, 1: 31-34.