

## EFEKTIVITAS PROMOTER $\beta$ -ACTIN IKAN MEDAKA (*Oryzias latipes*) DENGAN PENANDA GEN hrGFP (*HUMANIZED Renilla reniformis* *GREEN FLUORESCENT PROTEIN*) PADA IKAN LELE (*Clarias gariepinus*) Keturunan FO

Muhammad Hunaina Fariduddin Ath-thar<sup>\*)</sup>, Komar Sumantadinata<sup>\*\*)</sup>,  
Alimuddin<sup>\*)</sup>, dan Rudhy Gustiano<sup>\*)</sup>

### ABSTRAK

Promoter merupakan salah satu faktor penentu dalam teknologi transgenesis. Pada penelitian ini efektivitas promoter  $\beta$ -actin ikan medaka diuji pada telur ikan lele fase 1 sel dan 2 sel. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengembangbiakan dan Genetika Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini berlangsung selama 3 bulan. Insersi promoter dilakukan dengan cara menginjeksi telur hasil pemijahan buatan dengan plasmid DNA pm $\beta$ -actin-hrGFP pada fase telur 1 sel dan 2 sel. Konsentrasi DNA yang digunakan adalah 20  $\mu$ g/mL. Perkembangan embrio diamati pada 8, 12, 16, 20, 24 jam setelah gen disuntikkan serta 4 dan 8 jam setelah telur menetas. Derajat sintasan embrio (DKH), derajat penetasan (DP), dan persentase embrio mengekspresikan transgen (PEMT) dicatat selama pengamatan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa promoter  $\beta$ -actin ikan medaka aktif pada ikan lele, dengan adanya ekspresi gen hrGFP pada embrio setelah 8, 12, 16, 20, 24 jam setelah penyuntikan serta 4 dan 8 jam setelah telur menetas. Nilai DKH<sub>kontrol</sub> pada jam ke-24 adalah 97,1% dan untuk DKH<sub>injeksi</sub> pada jam ke-24 adalah 85,7%. Untuk PEMT pada telur yang disuntik pada fase 1 sel mempunyai persentase yang lebih tinggi (66,7%) dibanding telur yang disuntik pada fase 2 sel (50,0%). Derajat penetasan memperlihatkan bahwa jumlah telur untuk penyuntikan pada fase 1 sel lebih tinggi (93,3%) dibanding dengan yang disuntik pada fase 2 sel (55,0%). Total jumlah telur yang berhasil disuntik adalah 35 butir dan yang terekspresi sebanyak 20 butir (57,1%).

**ABSTRACT:** *Effectiveness of  $\beta$ -actine promoter of medaka (*Oryzias latipes*) using hrGFP (humanized *Renilla reniformis* green fluorescent protein) gene marker on walking catfish (*Clarias gariepinus*).  
By: Muhammad Hunaina Fariduddin Ath-thar, Komar Sumantadinata, Alimuddin, and Rudhy Gustiano*

*Promoter is one of the most important factors in transgenic. In this study, effectiveness of  $\beta$ -actine of medaka (*Oryzias latipes*) was examined in the eggs of walking catfish at the first cleavage and two cell stage. The experiment was carried out in the Laboratory of Fish Genetic, Fac. of Fisheries, Bogor Agricultural University for three months. Promoter was inserted by injecting artificial fertilization eggs with DNA pm $\beta$ -actin-hrGFP plasmid. DNA concentration was 20  $\mu$ g/mL. Eggs development were observed at 8, 12, 16, 20, 24 hours after injection, 4 and 8 hours after hatching. The result showed that  $\beta$ -actin promoter was active on embryo targets indicated by expression of hrGFP gene after 8, 12, 16, 20, 24 hours after injection as well as 4 and 8 hours after hatching. Survival rate within 24 hours were 97.1% for control and 85.7% for injected eggs. Successful of injection was higher on the first cleavage stage (66.7%) than that of on the two stage cell (50.0%). Hatching rate was also higher on the first cleavage (93.3%) than that of on the two cell stage (55.0%). Total number of eggs injected successfully was 35 eggs with 57.1% of them containing foreign genes.*

<sup>\*)</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

<sup>\*\*)</sup> Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor

**KEYWORDS:** *promoter, transgene, medaka, catfish, hrGFP*

## PENDAHULUAN

Penelitian mengenai transgenesis pada ikan sejauh ini belum pernah dilakukan di Indonesia, padahal keuntungan yang bisa diperoleh dari teknologi ini sangat banyak. Menurut Devlin *et al.* (1995), salah satu keuntungan teknologi transgenik adalah meningkatkan laju pertumbuhan. Keuntungan lain yang didapatkan dari transgenesis ini antara lain; meningkatkan daya tahan terhadap penyakit (Dunham, 2004) dan mengurangi laju konsumsi oksigen pada ikan (Cook *et al.*, 2000). Ikan transgenik bisa juga digunakan sebagai bioreaktor untuk memproduksi bahan-bahan yang bersifat komersial maupun yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Fletcher & Davies, 1991; Collas *et al.*, 2000).

Teknologi transgenesis adalah suatu proses mengintroduksi DNA asing ke hewan uji dengan tujuan untuk memanipulasi struktur genetiknya (Glick & Pasternak, 2003). Salah satu elemen penting yang harus diperhatikan dalam transgenesis ini adalah promoter. Menurut Glick & Pasternak (2003), promoter adalah bagian dari DNA di mana RNA polymerase menempel. Fungsi dari promoter ini adalah untuk mengarahkan RNA polymerase sehingga transkripsi terjadi. Hackett (1993) menyatakan bahwa promoter ada yang bekerja di semua jenis jaringan/sel (*ubiquitous*) dan ada yang bekerja pada jaringan spesifik. Promoter merupakan salah satu penentu/pengatur spatial-temporal ekspresi gen, sehingga promoter bisa dianalogikan sebagai *switch* suatu gen.

Pada awal perkembangan teknologi transgenesis pada ikan, banyak menggunakan promoter dari mamalia atau virus, tetapi aktivitasnya sangat rendah atau bahkan tidak ada sama sekali (Devlin, 1997). Sampai sejauh ini promoter yang berhasil digunakan pada *catfish* antara lain menggunakan CMV (*Cytomegalovirus*) (Volckaert *et al.*, 1994), promoter tikus MT (*Methallothioneine*), RSV-LTR (*Rous Sarcoma Virus-Long Terminal Repeat*) (Fletcher & Davies, 1991). Dari aspek *bio-safety*, para ahli menduga bahwa penggunaan promoter dari ikan lebih aman daripada promoter dari virus, meskipun belum diketahui dengan pasti efek yang mungkin muncul bila menggunakan elemen dari virus (Dunham, 2004).

Gen penanda yang dapat digunakan untuk pengujian efektivitas promoter adalah gen GFP (Chou *et al.*, 2001). Gen GFP memiliki keunggulan yaitu tidak memerlukan substrat tambahan untuk ekspresinya, memiliki kandungan protein yang berpendar dan bisa divisualisasikan ekspresinya pada sel dengan menggunakan sinar UV (Ultraviolet) (Chalfie, 1994 dalam Iyengar *et al.*, 1996). Salah satu jenis gen GFP yang dilaporkan mempunyai intensitas fluoresen lebih tinggi, lebih konsisten dan lebih rendah intensitas sitotoksitasnya dibanding GFP yang diisolasi dari *Aequorea victoria* adalah gen hrGFP (*Humanized Renilla reniformis Green Fluorescent Protein*) yang berasal dari Anthozoa (*soft coral*) jenis *Renilla reniformis* (Felts *et al.*, 2001). Gen GFP dapat berfungsi sebagai penanda (*marker*) dalam pengujian efektivitas suatu promoter (Chou *et al.*, 2001) atau sebagai gen target seperti dalam pembuatan ikan hias berpendar yang berwarna-warni (Gong *et al.*, 2002).

Mikroinjeksi adalah teknik transfer gen yang paling populer digunakan pada ikan (Hackett, 1993). Menurut Stuart *et al.* (1988) dan Pandian *et al.* (1991) dalam Collas *et al.* (2000), metode transgenik dengan mikroinjeksi masih merupakan metode yang paling sukses untuk diterapkan pada ikan. Inseri DNA yang baik dilakukan pada fase satu sel karena ketika sel membelah maka kemungkinan semua sel turunannya akan membawa gen tersebut (Devlin, 1997). Konsentrasi DNA juga merupakan faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan mikroinjeksi pada embrio ikan. Sejauh ini, konsentrasi DNA yang digunakan pada lele Afrika adalah 20 µg/mL (Volckaert *et al.*, 1994).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keefektifan promoter β-actin ikan medaka dengan penanda gen hrGFP pada ikan lele generasi F0 dan tingkat keberhasilan mikroinjeksi ikan lele transgenik generasi F0 yang disuntik pada fase telur satu sel dan dua sel.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengembangbiakan dan Genetika Ikan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilakukan selama 3 bulan. Bahan-bahan yang digunakan dalam

penelitian ini antara lain: ovaprime, larutan fisiologis, minyak mineral (ICN Biomedicals, Inc. Ohio, USA), dan induk ikan lele (*Clarias gariepinus*).

Konstruksi DNA yang digunakan berbentuk plasmid yang dikontrol oleh promoter  $\beta$ -actin ikan medaka dengan panjang fragmen 3,7 kb. Promoter tersebut diisolasi dari pOBA-109 yang dibuat oleh Takagi *et al.* (1994) dengan menggunakan metode PCR. Konstruksi DNA ini merupakan hasil karya Sawayama (2006).

Pembuatan gel plat mikroinjeksi dilakukan pada cawan petri. Sebanyak 12,5 mL agarose 1,2% (pelarut air) hangat dituangkan ke dalam cawan petri. Cetakan gel diletakkan pada cawan yang telah berisi agarose. Setelah agarose kering, cetakan gel diambil sehingga terbentuk cekungan. Gel plat ini bisa dibuat setiap waktu dan disimpan pada suhu 4°C. Gel plat bisa digunakan beberapa kali dan setelah dicuci dengan etanol 70% kemudian dengan air. Gel plat yang telah digunakan ditutup dengan plastik dan disimpan pada 4°C (Meng *et al.*, 1999).

Mikroinjektor ini terdiri atas mikroskop, *micromanipulator*, *magnetic stand*, jarum mikroinjeksi, *plastic two way stopper*, *teflon tubing*, *needle holder*, *microinjection capillaries*, *injector*, dan gel plat mikroinjeksi. *Micro-manipulator* ditempelkan pada *magnetic stand* yang telah melekat pada sebuah plat logam. *Injector* diisi dengan 3–4 mL minyak mineral dan secara langsung dihubungkan dengan *two way stopper*. *Two way stopper* ini dihubungkan dengan 3 feet 1-mm *teflon tubing*. *Teflon tubing* ini dihubungkan dengan *needle holder*. Untuk menghubungkan *teflon tubing* dengan *needle holder* dibutuhkan usaha yang ekstra. Rangkaian yang kuat dan rapat dari sistem mikroinjektor ini diperlukan karena akan terjadi tekanan ketika *injector* mendorong dan menarik cairan. *Needle holder* menempel pada *micromanipulator* yang membantu untuk menggerakkan jarum ketika dilakukan mikroinjeksi.

Cairan DNA diambil dengan menggunakan *micropipet* sebanyak 10  $\mu$ L lalu diletakkan pada *slide glass*. Selanjutnya cairan DNA tersebut disedot dengan menggunakan *capillary glass* yang telah menempel pada *needle holder*. Kemudian pada ujung *capillary glass* dimasukkan jarum mikroinjeksi. Setelah itu, cairan DNA didorong sehingga cairan DNA yang berada pada *capillary glass* berpindah ke jarum mikroinjeksi. Langkah terakhir adalah

*capillary glass* dilepas dari *needle holder* dan diganti dengan jarum mikroinjeksi yang telah berisi cairan DNA.

Telur dipindahkan dengan pelan-pelan pada lubang gel plat mikroinjeksi dengan menggunakan pipet. Sekitar 6 telur dapat diletakkan pada lubang gel plat ini. Jarum mikroinjeksi diatur posisinya dengan bantuan *micromanipulator*. Jarum mikroinjeksi diposisikan pada telur dari bagian atas telur dan cairan DNA diinjeksikan dengan pelan-pelan pada blastodisk. Normalnya, cairan DNA yang diinjeksikan mencapai kira-kira seperlima dari volume telur yang diinjeksi. Karena beberapa embrio kadang tidak pada posisi yang tepat untuk mikroinjeksi, posisinya dapat diarahkan dengan menggunakan tusuk gigi. Injeksi gen ke embrio dilakukan pada fase satu sel dan fase dua sel. Embrio yang telah diinjeksi dipindahkan ke cawan petri dan diinkubasi di akuarium pada suhu 28°C–30°C.

Telur yang tidak dibuahi dan mengalami deformasi dapat dengan mudah dikenali karena kecerahannya hilang, warnanya menjadi memutih dan keruh. Telur tersebut kemudian dibuang pada 4–5 jam setelah mikroinjeksi. Setelah itu telur-telur yang telah diinjeksi tadi diletakkan dalam akuarium inkubasi untuk penetasan. Perawatan dan pemeliharaan embrio yang telah diinjeksi ini adalah bagian yang penting dari proses penelitian tentang mikroinjeksi dan secara langsung akan berpengaruh terhadap jumlah dari embrio yang hidup/bertahan.

Telur dipindahkan ke dalam akuarium inkubasi pada suhu 28°C–30°C. Embrio yang mati dan mengalami deformasi (perubahan bentuk) dibuang 4 jam setelah injeksi dan setiap hari selama masa pemeliharaan. Larva kemudian dipindahkan ke dalam akuarium dengan suhu 28°C. Perkembangan embrio diamati pada jam ke-8, 12, 16, 20, 24 setelah gen disuntikkan serta jam ke-4 dan 8 setelah telur menetas.

Penghitungan derajat sintasan (DT), derajat penetasan (DP), persentase embrio mengekspresikan transgen (PEMT) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$DT_{\text{kontrol}} = \frac{\text{Jumlah embrio hidup}}{\text{Jumlah awal telur}} \times 100\%$$

$$DT_{\text{injeksi}} = \frac{\text{Jumlah embrio hidup}}{\text{Jumlah awal diinjeksi}} \times 100\%$$

$$DP_{kontrol} = \frac{\text{Jumlah telur menetas}}{\text{Jumlah awal telur}} \times 100\%$$

$$DP_{injeksi} = \frac{\text{Jumlah telur menetas}}{\text{Jumlah awal injeksi hidup}} \times 100\%$$

Pengamatan ekspresi transgen ini dilakukan jam ke-8, 12, 16, 20, 24 setelah gen disuntikkan serta jam ke-4 dan 8 setelah telur menetas. Pengamatan perkembangan embrio dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Zeiss Stemi DV4) dengan perbesaran 32x. Sedangkan untuk pengamatan ekspresi gen dilakukan dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* (Olympus BH2-RFCA) yang dilengkapi *reflected light fluorescent attachment* (Olympus BH2-RFC2) dengan perbesaran 40x. Hasil pengamatan difoto dengan menggunakan kamera digital Casio Exilim 5 megapiksel (EX-Z500) kemudian ditransfer ke komputer tanpa ada pengeditan lanjutan.

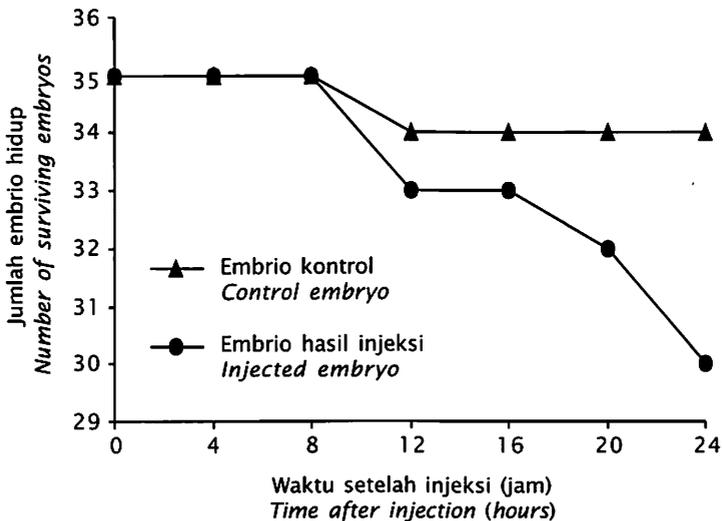
### HASIL DAN BAHASAN

Berdasar hasil yang diperoleh (Gambar 1) diketahui bahwa derajat sintasan embrio kontrol (97,1%) pada jam ke-24 lebih tinggi dibandingkan dengan telur yang diinjeksi gen (85,7%). Jumlah telur kontrol yang hidup hanya

mengalami penurunan jumlah sebanyak 1 butir telur pada jam ke-12 setelah diinjeksi. Pada jam-jam selanjutnya jumlah embrio yang hidup tidak mengalami penurunan. Sedangkan pada telur yang diinjeksi gen mengalami penurunan jumlah embrio yang hidup sampai dengan 5 butir telur pada jam ke-24 setelah diinjeksi.

Tabel 1 menyajikan data jumlah embrio yang mengekspresikan gen GFP dan derajat penetasan pada telur yang diinjeksi pada fase 1 sel dan fase 2 sel. Jumlah embrio yang berhasil disuntik pada fase 1 sel (15 butir) lebih sedikit dibandingkan jumlah embrio yang berhasil disuntik pada fase 2 sel (20 butir). Embrio yang mengekspresikan transgen menunjukkan jumlah yang sama untuk embrio yang disuntik pada fase 1 sel maupun fase 2 sel yaitu 10 butir telur. Persentase embrio mengekspresikan transgen yang disuntik pada fase 1 sel mempunyai persentase yang lebih tinggi (66,7%) dibanding embrio yang disuntik pada fase 2 sel (50,0%).

Pada parameter derajat penetasan bisa dilihat bahwa jumlah telur yang menetas untuk telur yang disuntik pada fase 1 sel menunjukkan jumlah relatif lebih tinggi yaitu 14 butir (93,3%) dibanding pada telur yang disuntik pada fase 2 sel yaitu 11 butir (55,0%) (Tabel 1).



Gambar 1. Derajat sintasan embrio ikan lele *Clarias* sp. pada jam ke-0, 4, 8, 12, 16, 20, dan 24 setelah diinjeksi gen hrGFP (*humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*)

Figure 1. Number of surviving *Clarias* sp. embryos at 0, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 after hrGFP gene (*humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*) injection

Tabel 1. Derajat penetasan (DP) dan persentase embrio mengekspresikan transgen (PEMT) pada embrio ikan lele (*Clarias gariepinus*) yang diinjeksi gen hrGFP (*humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*) pada Fase 1 Sel dan 2 Sel

Table 1. Hatching rates and percentages of *Clarias gariepinus* embryos, injected with hrGFP gene (*humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*) expressing transgen at one and two stage cell

Fase penyuntikan <i>Injection stage</i>	Jumlah telur <i>Number of eggs</i>	Persentase embrio mengekspresikan transgen (PEMT) <i>Percentages of embryo expressed transgen (PEET)</i>	Derajat penetasan <i>Hatching rate</i>
Fase 1 sel	15 butir	10 butir (66.7%)	14 butir (93.3%)
Fase 2 sel	20 butir	10 butir (50.0%)	11 butir (55.0%)
Total	35 butir	20 butir (57.1%)	25 butir (83.3%)

### Ekspresi Gen pada Embrio

Pengamatan ekspresi gen pada embrio (Gambar 2) memberikan indikasi penampakan ekspresi gen hrGFP pada embrio yang terlihat pada pukul ke-8, 12, 16, 20, 24 setelah diinjeksi gen serta jam ke-4 dan 8 setelah telur menetas. Perbandingan penampakan telur yang mengekspresikan gen hrGFP (Gambar 2B) dapat dibedakan dengan telur yang tidak mengekspresikan gen hrGFP (Gambar 2C). Transgen mulai terekspresi pada jam ke-4 setelah embrio diinjeksi tetapi sangat lemah maka tidak dapat difoto. Ekspresi gen terkuat terjadi pada saat jam ke-8 dan 12 setelah embrio diinjeksi. Pada jam ke-16, 20, dan 24 setelah embrio diinjeksi serta jam ke-4 dan 8 setelah menetas penampakan ekspresi gen pada embrio terlihat menunjukkan tanda penurunan dan akhirnya hilang.

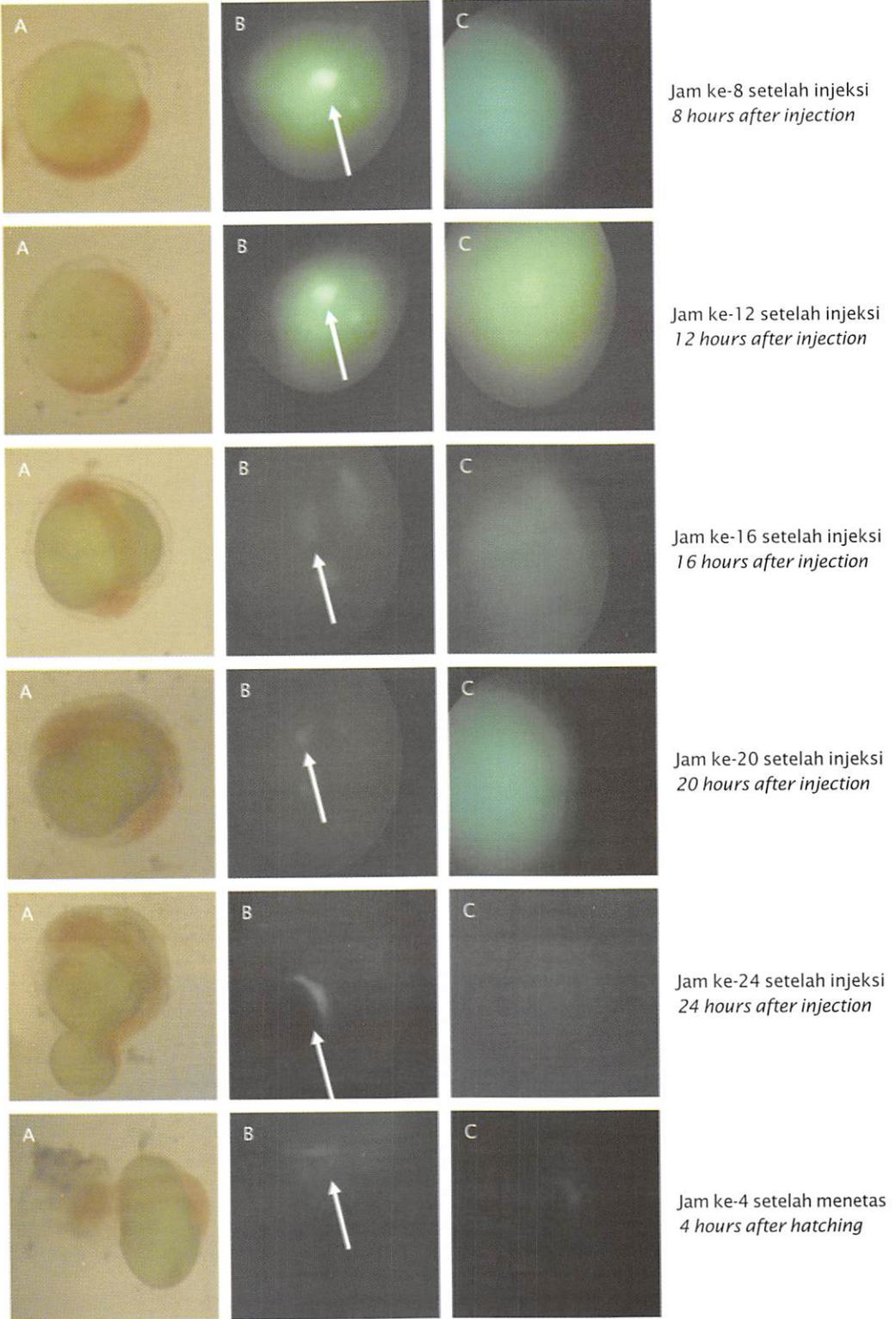
Berdasarkan hasil yang diperoleh terlihat bahwa kualitas telur yang digunakan pada penelitian ini termasuk bagus yang dibuktikan dengan nilai derajat penetasannya yang relatif tinggi (32 butir; 94,1%) dan nilai derajat sintasan yang relatif tinggi (97,1%) pada kontrol.

Nilai  $DP_{kontrol}$  sebanyak 94,1% menunjukkan nilai yang relatif lebih besar dibandingkan dengan nilai  $DP_{injeksi}$  sebanyak 83,3%. Penyebab nilai  $DP_{injeksi}$  lebih rendah dibanding  $DP_{kontrol}$  adalah karena adanya embrio yang hidup tetapi ada kemungkinan mengalami kerusakan akibat rusaknya jaringan karena injeksi. Hal tersebut menyebabkan pertumbuhan embrio terhambat dan tidak sempurna sehingga embrio tidak mampu menetas.

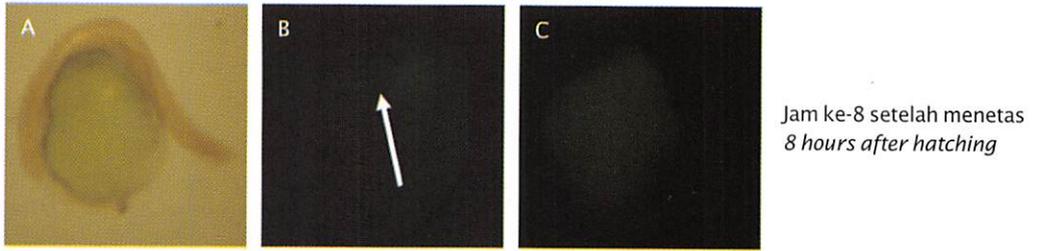
Nilai PEMT sebesar 57,1% membuktikan bahwa promoter medaka  $\beta$ -actin bisa aktif pada ikan lele. Meskipun mempunyai kekerabatan yang jauh dengan ikan lele (famili Clariidae) ternyata promoter yang diisolasi dari ikan medaka (famili Adrianichthyidae) ini bisa aktif pada ikan lele. Hal ini disebabkan promoter  $\beta$ -actin merupakan promoter yang bersifat *constitutive* (Liu, 1990 dalam Volckaert *et al.*, 1994) yaitu promoter yang mampu aktif tanpa adanya pengaruh dari luar misalnya rangsangan hormon maupun rangsangan suhu.

Injeksi gen lebih bagus dilakukan pada fase 1 sel (93,3%) dibandingkan pada fase 2 sel (94,1%) berdasarkan nilai derajat penetasan telur. Persentase dari jumlah telur yang mengekspresikan hrGFP juga lebih tinggi pada telur yang disuntik saat fase 1 sel. Hasil tersebut disebabkan ketika sel membelah maka semua sel turunannya akan membawa gen tersebut, tetapi jika gen disuntikkan pada saat fase 2 sel kemungkinan hanya 1 bagian sel yang membawa gen tersebut. Namun demikian, jumlah telur yang berhasil disuntik lebih tinggi pada saat fase 2 sel. Hal ini disebabkan waktu fase 1 sel yang cepat sehingga jumlah telur yang disuntik terbatas.

Ekspresi sementara (*transient*) seperti yang terjadi pada penelitian ini juga ditemukan pada beberapa ikan hasil penelitian transgenik, Di antaranya pada medaka (Winkler *et al.*, 1991; Hamada *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2001), lele Afrika (Volckaert *et al.*, 1994), kakap *Sparus auratus* (Garcia-Pozo *et al.*, 1998), ikan zebra (Higashijima *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 1999). Menurut Iyengar *et al.* (1996), terjadinya ekspresi sementara ini berhubungan erat



Gambar 2 lanjutan (Figure 2 continued)



Keterangan (Remark):

- A: Diamati dengan mikroskop medan terang (Observed with backlight microscope)
- B: Diamati dengan mikroskop fluorescent (telur mengekspresikan gen hrGFP)  
Observed with fluorescent microscope (no hrGFP gene expression)
- C: Diamati dengan mikroskop fluorescent (telur tidak mengekspresikan gen hrGFP)  
Observed with fluorescent microscope (with hrGFP gene expression)

Gambar 2. Penampakan gen hrGFP (*humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*) pada embrio ikan lele *Clarias* sp. pada jam ke-8, 12, 16, 20, dan 24 setelah diinjeksi gen hrGFP serta jam ke-4 dan 8 setelah menetas

Figure 2. *hrGFP (humanized Renilla reniformis green fluorescent protein) gene expression of Clarias sp. embryo at 8, 12, 16, 20, 24 hours after hrGFP gene injection and at 4 and 8 hours after hatching*

dengan ketahanan dari DNA yang diinjeksikan. Dijelaskan juga oleh Iyengar *et al.* (1996) bahwa tingginya ekspresi yang terjadi pada fase gastrula adalah kemungkinan sebagai hasil dari akumulasi DNA yang diinjeksikan yang berlanjut pada peningkatan replikasi pada fase pembelahan (*cleavage*) dan akumulasi dari enzim (RNA polymerase II) yang menyebabkan dimulainya transkripsi pada saat MBT (*mid-blastula transition*). Lebih lanjut dijelaskan bahwa degradasi dari DNA pada saat fase lanjutan pada pembelahan sel diperkirakan akan menyebabkan penurunan bertahap dari jumlah DNA sehingga ekspresi sementara gen hrGFP akan semakin melemah.

Pada penelitian ini, ekspresi sementara gen hrGFP pada telur lele mulai muncul pada fase gastrula awal atau fase permulaan adanya epiboly. Hal ini sejalan dengan hasil-hasil penelitian sebelumnya pada berbagai jenis ikan. Etkin dan Balcells (1985) dalam Winkler *et al.* (1991) menyatakan bahwa ekspresi sementara DNA asing hanya dapat dilihat pada embriogenesis awal pada fase *midblastula*. Pada ikan medaka disebutkan bahwa ekspresi gen wtGFP (*wild-type GFP*) dan mtGFP (*mutant GFP*) dimulai pada fase *midblastula* dan ekspresi terkuat terjadi sampai dengan fase gastrula akhir (Hamada *et al.*, 1998). Menurut Stuart *et al.* (1988) dalam Volckaert *et al.*

(1994), ekspresi gen terkuat pada ikan zebra terjadi pada fase gastrula awal. Untuk ikan medaka ekspresi gen terkuat terjadi pada fase gastrula (Chong & Vielkind, 1989 dalam Volckaert *et al.*, 1994). Sedangkan pada ikan Loach *Misgurnus* sp. terjadi pada gastrula akhir (Maclean *et al.*, 1987 dalam Volckaert *et al.*, 1994). Penelitian yang dilakukan Volckaert *et al.* (1994) mendapatkan hasil bahwa pada lele Afrika *Clarias gariepinus* ekspresi gen terkuat terjadi pada fase gastrula awal (permulaan *epiboly*). Pada jam ke-16 dan ke-24 setelah gen disuntikkan serta jam ke-4 dan 8 setelah telur menetas ekspresi gen semakin melemah.

Jumlah *copy* dari DNA yang diinjeksikan kemungkinan juga berpengaruh terhadap ekspresi sementara. Variasi jumlah *copy* DNA berpengaruh terhadap *level* lanjutan dari ekspresi sementara pada telur ikan (Iyengar *et al.*, 1996). Volckaert *et al.* (1994) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara tingkat ekspresi sementara dengan konsentrasi dari konstruksi DNA yang diintroduksi. Semakin tinggi konsentrasi yang disuntikkan maka tingkat ekspresi sementara yang terjadi akan semakin tinggi. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi DNA 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Konsentrasi ini diperkirakan sesuai untuk telur lele pada penelitian ini karena mempunyai kisaran yang sama dengan

referensi sebelumnya. Sejauh ini, konsentrasi DNA yang digunakan pada lele afrika adalah 20 µg/mL (Volckaert *et al.*, 1994).

#### KESIMPULAN

1. Promoter  $\beta$ -actin ikan medaka efektif pada ikan lele *Clarias gariepinus*.
2. Insersi gen yang dilakukan pada embrio fase 1 sel lebih baik dibandingkan dengan fase 2 sel.
3. Ekspresi terkuat gen hrGFP yang terlihat di embrio pada penelitian ini terjadi pada 8—12 jam setelah injeksi.
4. Sekitar 4—8 jam setelah menetas ekspresi gen hrGFP masih terlihat tetapi lemah dan akhirnya tidak terlihat.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Chou, C.Y., L.S. Horng, and H.J. Tsai. 2001. Uniform GFP-expression in Transgenic Medaka *Oryzias latipes* at the F0 Generation. *Transgenic Research*. 10: 303—315.
- Collas, P., H. Husebeye, and P. Alestrom. 2000. Transferring Foreign Genes into Zebrafish Eggs by Microinjection. *Transgenic Animal: Generation and Use*. p. 119—122.
- Cook, J.T., M.A. McNiven, and A.M. Sutterlin. 2000. Metabolic Rate of Pre-smolt Growth-enhanced Transgenic Atlantic Salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*. 188: 33—45.
- Devlin, R.H., T.Y. Yesaki, E.M. Donaldson, S.J. Du, and C.L. Hew. 1995. Production of Germline Transgenic Pacific Salmonids with Dramatically Increased Growth Performance. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*. 52: 1,376—1,384.
- Devlin, R.H. 1997. Transgenic Salmonids. In : Houdebine, LM (Ed.). *Transgenic Animal: Generation and Use*. Harewood Academic Publishers. Amsterdam. The Netherlands. p. 105—117.
- Dunham, R.A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. CABI Publishing. Cambridge, MA, USA. p. 179—181.
- Felts, K., B. Rogers, K. Chen, H. Ji, J. Sorge, and P. Vaillancourt. 2001. Recombinant *Renilla reniformis* GFP Displays Low Toxicity. *Stratagene* 13: 85—87.
- Fletcher, G.L. and P.L. Davies 1991. Transgenic Fish for Aquaculture. *Genetic Engineering*. 13: 331—371.
- Garcia-Pozo, S., J. Bejar, M. Shaw, and M.C. Alvarez. 1998. Effect of Exogenous DNA microinjection on Early Development Response of the Seabream *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7(4): 248—257.
- Glick, B.R. and J.J. Pasternak. 2003. *Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant DNA*. Third ed. ASM Press. Washington D.C. p. 110—115.
- Gong, Z., H. Wan, B. Ju, J. He, X. Wang, and T. Yan. 2002. Generation of Living Color Transgenic Fish. In: Shimizu N, Aoki T, Hirono I. and Takashima F. (eds.) *Aquatic Genomics: Steps Toward a Great Future*. (p. 329—339). Springer-Verlag. New York.
- Hackett, P.B. 1993. The Molecular Biology of Transgenic Fish. In: Hocachka and Mommesen (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier Science Publishers BV. 2: 218—221.
- Hamada, K., K. Tamaki, T. Sasado, Y. Watai, S. Kani, Y. Wakamatsu, K. Ozato, M. Kinoshita, R. Kohno, S. Takagi, and M. Kimura. 1998. Usefulness of the Medaka  $\beta$ -actin Promoter Investigated Using a Mutant GFP Reporter Gene in Transgenic Medaka *Oryzias latipes*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7: 173—180.
- Higashijima, S., H. Okamoto, N. Ueno, Y. Hotta, and G. Eguchi 1997. High-Frequency Generation of Transgenic Zebrafish Which Reliably Express GFP in Whole Muscles or the Whole Body by Using Promoter of Zebrafish Origin. *Developmental Biology*. 192: 289—299.
- Iyengar, A., F. Muller, and N. Maclean. 1996. Regulation and Expression of Transgenes fish - A Review. *Transgenic Research*. 5: 147—166.
- Meng, Anming, J.R. Jessen, and S. Lin. 1999. Transgenesis. In: Detrich HW III, Westerfield M and Zon LI (eds), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, New York. 60: 133—148.
- Sawayama, A. 2006. *Membuat Konstruksi Vektor untuk Mendapatkan Ekspresi Gen yang Tinggi dengan Memodifikasi 3'UTR*. Thesis. Tokyo University of Marine Science and Technology. Jepang. (in Japanese). p. 7—10.
- Takagi, S., G. Sasado, G. Tamiya, K. Ozato, Y. Wakamatsu, A. Takeshita, and M. Kimura. 1994. An Efficient Expression Vector for Transgenic Medaka Construction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 192—199.

- Volckaert, F.A., B.A. Hellemans, P. Galbusera, and F. Ollevier. 1994. Replication, Expression and Fate of Foreign DNA During Embryonic and Larval Development of the African Catfish *Clarias gariepinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(2): 57—69.
- Winkler, C., J.R. Vielkind, and M. Scharl. 1991. Transient Expression of Foreign DNA During Embryonic and Larval Development of the Medaka Fish *Oryzias latipes*. *Molecular General Genetics*. 226: 129—140.