

TRANSFER GEN PENYANDI HORMON PERTUMBUHAN IKAN NILA (*tiGH*) PADA IKAN LELE (*Clarias sp.*) DENGAN METODE MIKROINJEKSI

Gusrina¹⁾, Alimuddin²⁾, Komar Sumantadinata³⁾, dan Utut Widyastuti⁴⁾

¹⁾ Pusat Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan Tenaga Kependidikan Pertanian
Jl. Raya Jangari km 14, Desa Sukajadi, Karangtengah, Cianjur 43202
E-mail: *gusrina0@gmail.com*

²⁾ Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Kampus, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³⁾ Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB, Gedung PAU
Jl. Lingkar Kampus, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 13 Agustus 2009; Disetujui publikasi: 29 Oktober 2009)

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui keberhasilan introduksi gen penyandi hormon pertumbuhan (*Growth Hormone*, GH) pada embrio ikan lele sehingga dapat memperbaiki kecepatan tumbuhnya. Gen GH dari ikan nila (*tiGH*) yang dikontrol oleh promoter beta-aktin (mBP) dari ikan medaka dimikroinjeksikan ke dalam blastodisk embrio ikan lele fase satu sel. Konsentrasi konstruksi gen pmBP-*tiGH* yang ditransfer adalah 50 µg/mL akuabides. Parameter yang diamati meliputi derajat sintasan embrio (DKHe), derajat penetasan (DP) dan persentase individu ikan lele yang membawa pmB-*tiGH*. DKHe dihitung sebelum telur menetas, sedangkan DP dihitung pada saat semua telur menetas. Identifikasi ikan yang membawa pmB-*tiGH* ditentukan menggunakan metode PCR dengan primer spesifik untuk gen *tiGH*. Analisis ekspresi gen menggunakan metode RT-PCR. Hasil penelitian dari 100 embrio yang diinjeksi menunjukkan bahwa nilai DKHe (97%) dan DP (94%) pada kontrol (tidak dimikroinjeksi) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan mikroinjeksi (30% untuk DKHe, dan 28% DP). Ikan lele yang membawa pmBP-*tiGH* adalah 42,86% (12/28). Kesimpulan adalah bahwa *tiGH* masih diekspresikan pada benih ikan lele.

KATA KUNCI: transfer gen, GH, PCR, ikan lele, mikroinjeksi

ABSTRACT: *Transfer of gene encoding tilapia growth hormone (mBP-tiGH) in catfish (Clarias sp.) by microinjection method. By: Gusrina, Alimuddin, Komar Sumantadinata, and Utut Widyastuti*

This study was conducted to determine the success of introducing gene encoding growth hormone (GH) in catfish embryos that can improve its growth rate. GH gene of Nile tilapia, driven by medaka βactin promoter was injected to one cell stage of catfish embryos by microinjection method. The DNA solution (pmBP-tiGH) used was 50 µL/ml in SDW (Sterile Distillated Water). The parameters observed were survival rate of embryos (SRe), hatching rate (HR), and the percentage of individual carrying pmBP-tiGH. SRe was calculated before hatching and HR was calculated at the time of all embryos hatched. Transgenic individuals carrying tiGH were identified by PCR (Polymerase Chain Reaction) method with specific primer for tiGH gene. The analysis of gene expression was detected by RT-PCR. The results of the research from 100

catfish embryos showed that control have higher SRe (97%) and HR (94%) than SRe (30%) and HR (28%) of injected fish. The percentage of catfish carrying tiGH gene was 42.86% (12/28). Conclusion: tiGH was expressed in catfish.

KEYWORDS : *gene transfer, GH, PCR, catfish, microinjection*

PENDAHULUAN

Ikan lele merupakan ikan air tawar yang sangat digemari oleh masyarakat karena dagingnya empuk dan tidak terdapat banyak duri dalam tubuhnya. Produksi ikan lele dapat ditingkatkan dengan melakukan budidaya ikan secara intensif. Pertumbuhan ikan lele yang dibudidayakan oleh masyarakat telah mengalami pertumbuhan yang lambat dibandingkan pada saat pertama kali ikan lele didatangkan ke Indonesia. Untuk memperbaiki karakter-karakter yang berguna bagi akuakultur seperti peningkatan laju pertumbuhan maka perlu dilakukan suatu upaya agar ikan lele mempunyai kecepatan tumbuh yang lebih baik. Untuk memperbaiki kecepatan tumbuh pada ikan budidaya dapat dilakukan dengan beberapa pendekatan. Pendekatan secara genetis melalui seleksi, perbaikan teknik budidaya, dan nutrisi telah banyak dilakukan (Fjalested *et al.*, 2003). Pendekatan sistem endokrin untuk mengontrol pertumbuhan telah dilaporkan oleh beberapa peneliti (McLean & Devlin, 2000). Dari beberapa pendekatan tersebut terdapat beberapa kelemahan antara lain: pendekatan genetis melalui seleksi membutuhkan waktu, biaya dan tenaga yang banyak.

Saat ini sedang dicoba suatu metode yang dapat mengatasi masalah tersebut yaitu teknologi transgenesis. Teknologi transgenesis merupakan suatu teknik rekayasa genetika dengan cara mengintroduksi gen yang khas pada ikan untuk mendapatkan keunikan yang memiliki nilai tambah. Sedangkan menurut Beardmore & Porter (2003) transgenik adalah organisme dimana DNA dari donor dimasukkan dan bergabung dengan menggunakan teknik *in vitro*. Teknologi transfer gen telah dikembangkan untuk memperbaiki karakter kuantitatif dan kualitatif. Gen dari individu suatu spesies diisolasi, dihubungkan ke promoter (sebagai sekuens pengatur DNA atau *on/off switches*), diklon, dan diperbanyak terutama dalam plasmid (Dunham, 2003).

Teknologi transfer gen pada *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) berdasarkan penelitian Dunham *et al.* (1987) menggunakan

konstruksi gen *Mouse Metallothionein-human growth hormone fusion gene* (*MthGHg*), 20% ikan dilakukan analisis pada usia 3 minggu dan dilakukan *sampling* ulang pada usia 3 bulan dan hasilnya hanya sekitar 4% ikan yang mengandung *MthGHg*. Berdasarkan penelitian Zhu *et al.* (1985) dimana *hGHg* dimasukkan ke dalam *germinal disc* ikan koki dan hasilnya 75% ditransformasikan dan terjadi peningkatan pertumbuhan 4,6 kali dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan Chourrout *et al.* (1986) melakukan injeksi pada sitoplasma telur trout yang telah dibuahi dengan gen konstruk *hGHg* c DNA dan 33% diintegrasikan ke dalam genom pada usia 30 hari embrio tetapi tidak menunjukkan ekspresi dan peningkatan pertumbuhan. Smitherman *et al.* (1996) telah melakukan transfer gen pada *Ictalurus punctatus* dan *Clarias gariepinus* dengan menggunakan metode mikroinjeksi dan elektroforasi, hasilnya gen asing tersebut telah diekspresikan dan diturunkan dimana pertumbuhan transgenik *Ictalurus punctatus* mengandung gen *GH* salmon 20% - 40% lebih cepat dibandingkan dengan kontrol.

Menurut Beardmore & Porter (2003), transgenik dibedakan menjadi dua tipe yaitu autotransgenik (gen asing yang diintroduksi berasal dari spesies yang sama) dan allotransgenik (gen asing yang diintroduksi berasal dari spesies yang berbeda). Aplikasi teknologi transgenik pada ikan lele di Indonesia belum dilakukan. Berdasarkan hal tersebut dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan transfer gen pertumbuhan ikan nila (*tiGH*) dengan metode mikroinjeksi pada ikan lele.

BAHAN DAN METODE

Pemeliharaan Induk dan Pemijahan

Induk ikan lele dipilih dari kolam pemeliharaan di Pusat Pengembangan dan Pemberdayaan Pendidik dan Tenaga Kependidikan Pertanian Cianjur. Induk ikan lele jantan dan betina dipilih yang matang gonad dan dilakukan pemijahan secara buatan. Induk betina yang telah matang gonad disuntik ovaprim dengan dosis 0,3 mL/kg bobot ikan,

sedangkan induk jantannya menggunakan dosis 0,1 mL/kg bobot ikan. Setelah 10 - 12 jam dilakukan *stripping* pada induk betina untuk mendapatkan telur. Induk jantan dibedah untuk diambil spermanya. Sperma yang didapat diencerkan menggunakan larutan fisiologis yaitu larutan NaCl 0,9%. Setelah itu, telur dan sperma dicampur dalam 1 wadah dan diberi air lalu diaduk dengan menggunakan bulu ayam. Untuk menghilangkan daya rekat telur yang dapat mengganggu saat melakukan penyuntikan, larutan tanin ditambahkan dengan konsentrasi 0,5 mg/L selama 5 detik sambil diaduk dan dibilas dengan air sebanyak 2 kali. Telur yang telah dibuahi diambil lalu disimpan pada cawan petri untuk selanjutnya dilakukan perlakuan mikroinjeksi.

Pembuatan Gel Agarosa Penahan Embrio

Pembuatan gel dilakukan pada cawan petri dengan cara membuat larutan agarosa 2% yaitu sebanyak 0,6 gram agarosa dicampur dengan akuades sebanyak 30 mL dan dipanaskan ke dalam *microwave* selama 2 menit. Larutan tersebut dibiarkan pada suhu ruang dan jika sudah hangat dituangkan ke dalam cawan petri yang di bagian tengahnya terdapat cetakan marmor. Setelah agarosa membeku, cetakan marmor dipindahkan sehingga terbentuk cekungan. Gel penahan embrio bisa

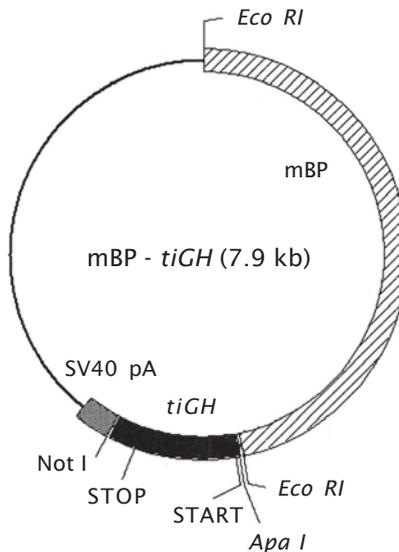
digunakan beberapa kali dan setelahnya dicuci dengan 70% ethanol kemudian dibilas dengan air destilasi. Gel penahan embrio yang telah digunakan ditutup dengan plastik dan disimpan pada 4°C (Meng *et al.*, 1999).

Perbanyak Konstruksi Gen

Konstruksi gen berupa plasmid pmBP-*tiGH* berisi gen GH ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan promotor β -Aktin (mBP) dari ikan medaka (*Oryzias latipes*). Konstruksi gen yang digunakan berasal dari Kobayashi *et al.* (2007), untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1. Perbanyak konstruksi gen dilakukan dengan menggunakan prosedur standar (Sambrook *et al.*, 1989).

Mikroinjeksi

Mikroinjeksi dilakukan pada embrio ikan lele fase 1 sel dengan prosedur mengikuti Kobayashi *et al.* (2007). Larutan DNA yang digunakan diambil dari larutan stok yang berisi konstruksi plasmid Mbp-*tiGH* Kobayashi *et al.*, (2007). Konsentrasi larutan yang digunakan sebanyak 50 μ g/mL dalam akuabides. Embrio yang telah disuntik diinkubasi pada wadah terkontrol yang terpisah dari wadah inkubasi untuk embrio normal tanpa penyuntikan. Teknik penanganan dan pendederan benih ikan lele sesuai standar SNI (2004). Jumlah telur yang dimikroinjeksi sebanyak 100 butir.



Gambar 1. Peta konstruksi gen mBP-*tiGH*

Figure 1. Map of the mBP-*tiGH* gene construction

Telur dipindahkan secara perlahan pada lubang gel penahan embrio mikroinjeksi dengan menggunakan pipet. Telur yang akan dimikroinjeksi diletakkan pada lubang gel penahan embrio ini. Jarum mikroinjeksi diatur posisinya dengan bantuan mikromanipulator. Jarum mikroinjeksi diposisikan pada bagian atas telur dan cairan DNA diinjeksikan dengan perlahan pada blastodisk. Normalnya, cairan DNA yang diinjeksikan mencapai kira-kira seperlima dari volume telur yang diinjeksi. Embrio yang telah diinjeksi dipindahkan ke cawan petri dan diinkubasi pada suhu 28°C.

Penetasan Telur dan Pemeliharaan Larva

Telur hasil mikroinjeksi dipindahkan dalam akuarium inkubasi berukuran 80 X 60 X 40 cm yang telah diberi *Methylene Blue*, kemudian diberi aerasi sedang. Wadah dilengkapi dengan *heater* agar temperatur air stabil pada suhu 28°C. Telur yang tidak dibuahi dan mengalami deformasi dapat dengan mudah dikenali, kemudian dibuang pada 4-5 jam setelah mikroinjeksi. Telur-telur yang telah diinjeksi menetas pada jam ke-24 setelah pembuahan.

Pemeliharaan larva dilakukan dengan pemberian pakan alami berupa *Artemia* secara *ad libitum* yang dimulai pada hari ke-2 hingga ke-4. Pada hari ke-3 larva mulai diberi pakan alami cacing rambut yang dicacah hingga halus sampai larva lele berumur 14 hari. Setelah itu larva lele mulai diberi pakan buatan secara *at satiation*.

Identifikasi Individu Membawa Transgen

Individu ikan transgen keturunan nol (F0) yang membawa gen GH diidentifikasi menggunakan metode PCR dengan cetakan DNA genomik yang telah diekstraksi dari sirip ekor pada umur 4 minggu. Isolasi DNA genomik dilakukan menggunakan *DNA Purification Kit* (Puregene, Minneapolis, USA) dengan prosedur sesuai manual. PCR dilakukan menggunakan 2 set primer spesifik yang bisa membedakan tiGH dengan gen GH *endogenous* ikan lele, yaitu tiGH-1F *Forward primer* (5'-AGACAGCCAGCGTTTGTCT-3') dan tiGH-1R *Reverse primer* (5'-CCAGGACTCCAACCGTCCAT-3'). Program PCR yang digunakan adalah 1 siklus (95°C selama 5 menit), 35 siklus (95°C selama 20 detik, 62°C selama 15 detik, 72°C selama 20 detik), dan 1 siklus (72°C selama 3 menit). Setelah mesin menunjukkan suhu 4°C,

maka mesin dapat dimatikan. Selanjutnya hasil PCR dapat langsung dianalisis dengan elektroforesis atau disimpan di dalam *refrigerator* dengan suhu 4°C.

Pembesaran Ikan Transgenik F0

Benih ikan lele yang positif membawa transgen di jaringan siripnya dipelihara sampai berumur 3 bulan. Benih dipelihara dalam wadah pemeliharaan dengan pemberian pakan sebanyak 3 kali sehari dengan tingkat pemberian pakan berkisar antara 3%-5% bobot ikan per hari. Jenis pakan yang diberikan disesuaikan dengan ukuran larva dan benih yaitu pakan alami dan pakan buatan. Pakan alami antara lain *Artemia*, *Daphnia*, dan cacing rambut, sedangkan pakan buatan dalam bentuk pelet.

Analisis Ekspresi Transgen

Ekspresi transgen pada benih ikan yang telah berumur 3 bulan dianalisis menggunakan metode RT-PCR. RNA diekstraksi dari sirip ekor ikan transgenik F0. Prosedur isolasi RNA dan sintesa cDNA menggunakan prosedur Boonanuntanasarn *et al.* (2002). Ekstraksi RNA diperoleh dari sampel jaringan sirip ekor sebanyak 3 sampel yang dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL yang berisi ISOGEN (Nippon Gene, Japan) dan dilakukan penghancuran sampai terjadi lisis. Kontaminasi DNA yang ada akan didegradasi menggunakan DNase RQ1 Rnase-free (Promega, USA). Setelah perlakuan phenol-chloroform dan ethanol, pelet RNA akan dilarutkan dengan air yang mengandung diethylpyrocarbonate (air-DEPC). cDNA disintesis dari 2-3 µg RNA total menggunakan Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, USA) dengan primer Dt3'RACE-VECT (5'-GTAATACGAATAACTATAGGGCACGC GTGGTTCGACGGCCCGG-GCTGGT T T T T T T T T T T T T T T T T T T -3').

PCR dilakukan dengan volume reaksi 10 µL yang mengandung 1 µL *LA buffer* Ex Taq, 1 µL dNTPs mix, 0,05 µL *LA Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga Japan), 1 µL cDNA dan 1 µL dari masing-masing *primer forward* dan *reverse* yang spesifik untuk transgen yaitu *primer Forward* adalah MBP-F1 dan *primer Reverse* adalah tiGH. *Primer forward* MBP-F1 adalah 5'-ACGTTACCCGTCGAGTTGA-3' dan *primer reverse* tiGH *Reverse* adalah 5'-TGAGTCGACCAATGCAACACATTTATTTACAGAT-3'. Jumlah siklus PCR yang digunakan adalah 35 siklus. Dua µL hasil PCR dielektroforesis

menggunakan 0,7% gel agarose, di-staining dengan etidium bromida, dan difoto dengan kamera digital dalam kondisi disinari dengan cahaya ultraviolet.

Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengukur beberapa parameter yaitu derajat penetasan, derajat sintasan embrio, persentase ikan yang membawa gen GH dan hasil analisis DNA.

Derajat penetasan (DP) adalah persentase jumlah telur yang menetas dibandingkan dengan jumlah telur awal. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$DP = \frac{\Sigma \text{ telur menetas}}{\Sigma \text{ awal telur}} \times 100\%$$

Derajat sintasan (DKH) embrio, larva, dan benih dihitung dengan melihat persentase jumlah embrio, larva, dan benih dibandingkan dengan jumlah awal embrio, larva dan benih. Perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$DKH = \frac{\Sigma \text{ yang hidup}}{\Sigma \text{ awal yang dipelihara}} \times 100\%$$

Persentase ikan membawa gen GH ini menentukan persentase keberhasilan dari injeksi DNA ke dalam embrio. Persentase ini didapatkan dari perbandingan jumlah ikan yang di dalamnya terdapat gen tiGH yang telah diinjeksikan dibandingkan dengan jumlah total ikan yang hidup setelah dilakukan injeksi. Perhitungan persentase ikan yang membawa gen GH ini dapat dihitung dengan rumus perhitungan sebagai berikut :

$$PIMG_{injeksi} = \frac{\text{Jumlah ikan yang membawa gen tiGH}}{\text{Jumlah ikan yang hidup}} \times 100\%$$

HASIL DAN BAHASAN

Derajat sintasan embrio (DKHe), derajat penetasan (DP) telur ikan lele yang mengalami perlakuan mikroinjeksi lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1). Rendahnya nilai DKHe dan DP pada perlakuan disebabkan oleh kerusakan sel telur karena proses penyuntikan. Proses penyuntikan telur dilakukan satu persatu sehingga dibutuhkan waktu dan ketrampilan agar telur yang disuntik tidak rusak. Selama proses penyuntikan terjadi kebocoran pada telur dengan keluarnya kuning telur, hal ini dapat disebabkan oleh jarum yang dimasukkan ke *blastodisc* terlalu dalam. Selain itu selama proses penyuntikan telur diletakkan pada *gel* penahan telur dan terjadi pemaparan telur selama proses penyuntikan sehingga telur yang telah dibuahi berhubungan langsung dengan udara. Selain itu rendahnya nilai DKHe dan DP pada perlakuan mikroinjeksi diakibatkan oleh ketrampilan peneliti dalam proses penyuntikan seperti pada saat penyuntikan telur ikan biasanya menempel pada jarum dan untuk melepaskannya jarum harus diangkat pada permukaan gel agarosa. Hal ini diperkuat oleh Alimuddin *et al.* (2003) bahwa bervariasinya tingkat sintasan dan persentase ikan yang membawa gen yang telah disuntikkan juga bergantung pada ketrampilan operator dan spesies ikan yang diujikan. Ikan lele merupakan ikan air tawar yang mempunyai ukuran telur yang kecil dan lengket sehingga relatif sulit untuk melakukan proses

Tabel 1. Derajat sintasan embrio (DKHe), derajat penetasan (DP), dan persentase ikan lele yang membawa gen mBP-tiGH (PIMG)

Table 1. Survival rate of embryo (SRe), hatching rate (HR), and percentage of catfish carrying transgenes mBP-tiGH (PIMG)

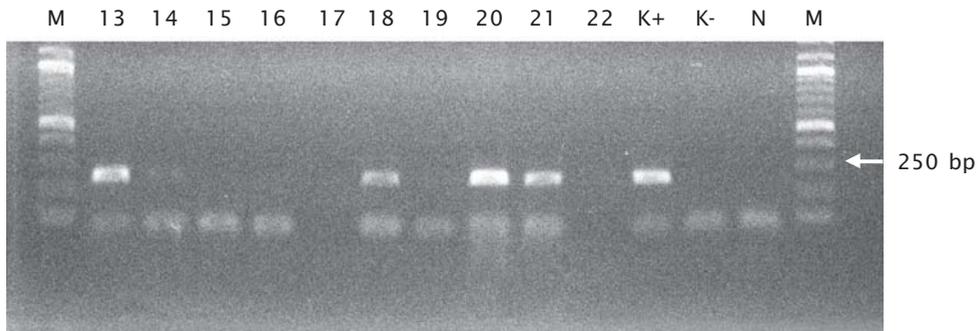
Perlakuan Treatment	Σ telur Number of eggs (butir/pcs)	DKHe Survival Rate of Embryo (%)	DP Hatching Rate (%)	PIMG Percentage of Transgenic (%)
Kontrol Control	100	97	94	0
Mikroinjeksi Microinjection	100	30	28	42.86

mikroinjeksi karena telur akan menempel pada jarum suntik.

Keberadaan gen mBP-tiGH pada telur ikan lele dianalisis dengan PCR menggunakan primer oligonukleotida yang spesifik untuk gen GH eksogenous. Berdasarkan hasil PCR sampel ikan lele yang diberi perlakuan transfer gen sebanyak 28 ekor ikan yang hidup diperoleh hasil positif pada 12 sampel yaitu sampel no : 1, 2, 3, 4, 5, 13, 18, 20, 21, 25, 26 dan 28. Pada Gambar 2 memperlihatkan hasil PCR pada sampel 13 - 22. Menurut Alimuddin *et al.* (2003), bila gen terintegrasi ke dalam genom pada fase satu sel, gen akan didistribusikan ke setiap sel dan 50% dari germ sel akan memiliki gen asing tersebut setelah meiosis. Namun biasanya integrasi terjadi setelah sel membelah beberapa kali. Oleh karena itu, akan terdapat dua macam sel, yaitu sel yang memiliki gen yang ditransfer dan yang tidak membawa. Hal ini dikenal dengan istilah mosaik. Keadaan mosaik inilah yang menyebabkan tidak semua sel telur yang diinjeksi akan membawa gen yang disisipkan. Pada penelitian ini dari 100 butir telur diinjeksi, persentase ikan yang membawa gen tiGH sebanyak 42,86% (12 ekor dari 28 ekor benih ikan lele yang hidup). Berdasarkan hasil penelitian Bambang (2008) di mana telah melakukan penyuntikan gen GH dengan konstruksi Mbp-tiGH dengan konsentrasi 50 µg/mL telah berhasil diintroduksi pada embrio ikan lele dumbo, dengan persentase

ikan yang membawa konstruksi gen pada siripnya sebesar 11,1%. Pada penelitian transfer gen untuk ikan *channel catfish*, Dunham *et al.* (1987) menggunakan konstruksi gen *Mouse Metallothionein-human growth hormone fusion gene* (MthGHg), 20% ikan yang ditransfer gen dilakukan analisis pada usia 3 minggu dan dilakukan *sampling* ulang pada usia 3 bulan dan hasilnya hanya sekitar 4% ikan yang mengandung MthGHg. Kobayashi *et al.* (2007) menggunakan konstruksi gen yang sama tetapi pada ikan nila memberikan hasil sebanyak 5,7% yaitu sebanyak 8 ekor dari 140 individu. Rachman & Maclean (1999) menganalisis 118 ekor ikan nila yang diinjeksi dengan konstruksi OPAPCsGH dan hanya 3 ekor yang membawa konstruksi gen tersebut pada gonadnya. Dari ketiganya, frekuensi transmisi konstruksi OPAPCsGH pada keturunan selanjutnya (F1) masing-masing sebesar 1%, 8% dan 6%. Untuk memperbesar peluang mendapatkan ikan yang membawa konstruksi gen asing dalam gonadnya, jumlah telur yang disuntik harus diperbanyak dan penyuntikan harus dilakukan pada tahap perkembangan satu sel.

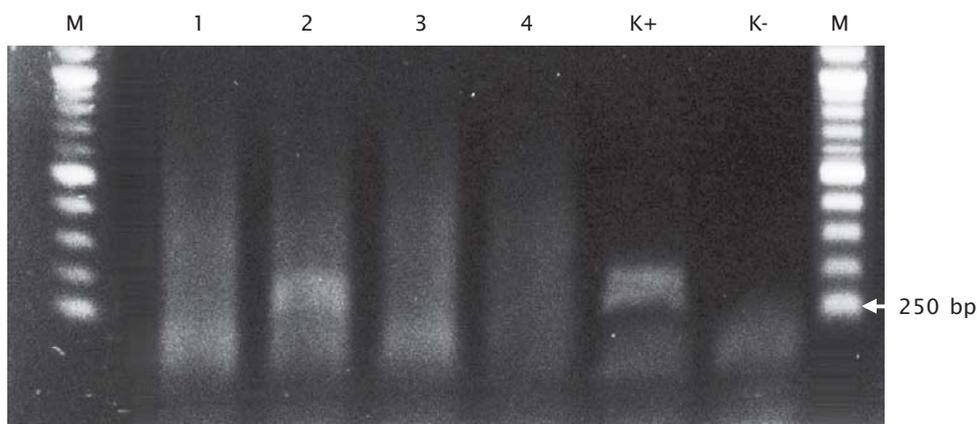
Berdasarkan hasil analisis RT-PCR, ada satu individu dari tiga sampel yang diuji memperlihatkan ekspresi transgen (Gambar 3). Hal ini memperlihatkan bahwa gen yang telah disisipkan tersebut terekspresi, walaupun tidak semua mengekspresikan transgen. Menurut Iyengar *et al.* (1996), bahwa pada awal



M merupakan Marker DNA 1-log ladder, N adalah sampel ikan nontransgenik, K+ adalah kontrol positif, K- adalah kontrol negatif dan 13 - 22 adalah hasil amplifikasi PCR ikan lele (M : 1-kb DNA ladder marker, N : Nontransgenic, K+ : positive control, K- : negative control and 13 - 22 : PCR products amplified from catfish)

Gambar 2. Elektroforesis hasil PCR dengan primer spesifik gen mBP-tiGH pada ikan lele

Figure 2. Electrophoresis of PCR products using mBP-tiGH gene specific primers in catfish



M merupakan Marker DNA 1-log ladder, 1 - 3 adalah hasil amplifikasi PCR cDNA ikan lele dan 4 adalah sampel ikan nontransgenik, K+ adalah kontrol positif, K- adalah kontrol negatif (M : 1-kb DNA ladder marker, 1 - 3 : PCR products amplified cDNA froms catfish and 4 : Nontransgenic, K+ : positive control, K- : negative control)

Gambar 3. Deteksi ekspresi dari transgen menggunakan metode RT-PCR menggunakan cetakan cDNA

Figure 3. Detection of transgene expression by RT-PCR analysis with cDNA template

perkembangan embrio, gen yang ditransfer akan direplikasi tanpa mengalami integrasi ke dalam genom resipien. Lebih lanjut dijelaskan bahwa setelah mengalami beberapa pembelahan sel, sebagian gen asing tersebut terintegrasi secara acak ke dalam genom resipien di salah satu blastomer sehingga akan terdapat dua macam sel, yaitu sel yang membawa transgen dan sel yang tidak membawa transgen. Hal ini mengakibatkan tidak semua sel membawa transgen atau dikenal dengan istilah kejadian mosaik (*mosaic*). Menurut Chou *et al.* (2001) ketika fragmen DNA yang terdiri atas suatu gen target atau gen penanda homolog maupun heterolog ditransfer, maka akan sangat umum menemukan kejadian mosaik. Selain itu, menurut Alimuddin *et al.* (2003) selain terintegrasi ke dalam genom, ada sebagian dari gen asing berada dalam suatu posisi ekstrakromosomal. Lebih lanjut dijelaskan bahwa gen asing yang terintegrasi akan stabil di dalam genom, sementara dalam bentuk ekstrakromosomal akan terdegradasi oleh endogeneous nuclease.

KESIMPULAN

Gen penyandi hormon pertumbuhan ikan nila (*tiGH*) dapat ditransfer pada ikan lele dilihat dari individu yang membawa transgen yaitu

42,86% (12 dari 28 ekor). Berdasarkan analisis RT-PCR menggunakan cetakan cDNA, gen *tiGH* terekspresi pada ikan lele.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar Sukabumi dan seluruh staf Laboratorium Genetika atas segala bantuan dan fasilitas yang diberikan selama melakukan penelitian ini. Selain itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Kobayashi dan kawan-kawan (Tokyo University of Marine Science and Technology, Jepang) yang memberikan konstruksi gen yang digunakan untuk penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Yoshizaki, G., Carman, O., & Sumantadinata, K. 2003. Aplikasi transfer gen dalam akuakultur. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 2 (1) : 41 -50.
- Bambang, K.G. 2008. Introduksi dan persentase ikan yang membawa gen GH Growth Hormone ikan nila *Oreochromis niloticus* pada ikan lele dumbo *Clarias* sp generasi F0. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Beardmore, J.A., & Joanne, S., & Porter. 2003. Genetically modified organisms and aquaculture. *FAO Fisheries Circular*. No. 199. Rome. 35 pp.
- Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Morita, T., & Takeuchi, T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.*, 4 : 256 - 266.
- Chourrout, D., Guyomard, R., & Houdebine, L.M. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51: 143 - 150.
- Chou, C.Y., Horng, L.S., & Tsai, H.J. 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka *Oryzias latipes* at the F0 generation. *Transgenic Research*, 10 : 303 - 315.
- Dunham, R.A. 2003. *Aquaculture and fisheries biotechnology genetic approaches*. CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire OX 10 8 DE. UK.
- Dunham, R.A., Ramboox, A.C., Duncan, P.I., Hayat, M., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Gonzales-Villasenor, I. & Powers, D.A. 1992. Transfer, expression and inheritance of salmonid growth hormone in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and effect on performance traits. *Mol.Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 380 - 389.
- Dunham, R.A., Eash, J., Askin, J., & Townes, T.M. 1987. Transfer of the metallothionein human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116 : 87-91.
- Effendi, M.I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusatama. Yogyakarta.
- Fjalested, K.T., Moen, T., & Gomez-Raya, L. 2003. Prospect for genetic technology in Salmon breeding programmes. *Aquaculture Res*, 34 : 397 - 406.
- Iyengar, A., Muller, F., & Maclean, N. 1996. Regulation and expression of transgenes fish-a review. *Transgenic research* 5 : 147 - 166.
- Kobayashi, S., Alimuddin, Morita, T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuci, T., & Yoshikazi, G. 2007. Transgenic Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270 : 427 - 435.
- Lagler, K.F. 1972. *Freshwater Fisheries Biology* (2nd Ed). Wm.C. Brown Company Publisher, London.
- McLean, E. & Devlin, R.H. 2000. Application of biotechnology to enhance growth of salmonid and other fish. In: Fingerma, M.; Nagabhusnam, R.; Thompson, M-F (Eds). *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Science Publisher, Enfield, NH, USA, pp. 17 - 55.
- Meng, Anming, Jessen, J.R., & Lin S. 1999. Transgenesis. In: Detrich HW III, Westerfield M and Zon LI (Eds), *Methods in Cell Biology* Vol. 60 (pp.133-148) Academic Press, New York.
- Rahman, M.A. & Maclean, N. 1992. Production of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-cell-stage microinjection. *Aquaculture*, 105 : 219 - 232.
- Smithermen, R.O., Dunham, R.A., & Whitehead, P.K. 1996. Selection, hybridization and genome manipulation *Siluroidei*. In: The biology and culture of catfishes. M. Legendre, J.P. Proteau eds. Aquatic Living Resour, Vol. 9, Hors Serie, p. 93-102.
- Sambrook, J., Frittsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- SNI. 2004. *Standar Nasional Indonesia Pembenuhan Ikan*. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Zhu, Z., Li, G., He, L., & Chen, S. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 1: 31 - 33.