

Aplikasi Elektroforasi Sperma untuk Produksi Ikan Lele Mutiara (*Clarias* sp.) Transgenik

Sperm Electroporation Application for
Transgenic Mutiara Catfish (*Clarias* sp.) Production

Ibnu Dwi Buwono^{*)}

^{*)} Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNPAD

Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor. Telp.022-87701519 Faks. 022-87701518

Email Korespondensi: ibnudw1@yahoo.com. Telp. 0818616058

Abstrak

Penelitian transfer gen hormon pertumbuhan pada sperma ikan menggunakan teknik elektroforasi untuk perbaikan pertumbuhan telah berhasil dilakukan pada spesies *salmon*, *catfish*, *common carp* maupun *tilapia*. Pemberian kejutan elektrik (125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa 3 dan 5) pada sperma ikan lele mutiara memberikan peluang besar gen GH lele dumbo masuk dan bergabung dengan DNA genom ikan inang saat proses elektroforasi.

Rekombinasi GH eksogen (GH lele dumbo) dan GH endogen menyebabkan *over ekspresi* pertumbuhan ikan lele mutiara transgenik. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kelipatan tumbuh ikan lele mutiara transgenik hasil elektroforasi 125 V/cm-pulsa 3, 125 V/cm-pulsa 5, 50 V/cm-pulsa 3 dan 50 V/cm-pulsa 5 berturut-turut 3,53 kali; 3,05 kali; 2,75 kali dan 2,76 kali dari ukuran ikan non transgenik.

Kata kunci : *elektroforasi, ikan lele mutiara, sperma, transgenik*

Abstract

Growth hormone gene transfer studies on fish sperm using electroporation techniques for improvement of growth has been successfully carried out on the species of salmon, catfish, common carp and tilapia. Administration of an electric shock (125 V/cm and 50 V/cm with the number of pulses 3 and 5) on sperm catfish mutiara provide great opportunities African catfish GH gene entry and join the genomic DNA of the host fish during electroporation process.

Recombination exogenous GH (African catfish GH) and endogenous GH causes over-expression of the growth transgenic mutiara catfish. The results showed an average multiple of growing transgenic mutiara catfish of electroporation 125 V/cm-pulse 3, 125 V/cm-pulse 5, 50 V/cm-pulse 3 and 50 V/cm-pulse 5 respectively 3, 53 times; 3.05 times; 2.75 times and 2.76 times of the size of non-transgenic fish.

Keywords: *electroporation, mutiara catfish, sperm, transgenic*

Pendahuluan

Aplikasi teknologi transgenesis dewasa ini berguna untuk mengatasi kendala pertumbuhan ikan yang lambat, oleh karena memungkinkan untuk memasukkan gen-gen asing tunggal (*single gen*) ke dalam genom sperma ikan yang dibudidayakan sehingga meningkatkan perbaikan genetik ikan ke arah sifat yang lebih menguntungkan (Fletcher *et al.*, 2002).

Tujuan utama transfer gen adalah memasukkan gen asing yang diharapkan akan terintegrasi dengan genom ikan inang sehingga genom inang memiliki tambahan gen asing yang memperbaiki ekspresi gen inang (*over-ekspresi*) yang akan ditransmisikan kepada generasi keturunannya (Hackett, 1993). Terdapat 2 teknik transfer gen yang umum diaplikasikan pada genom ikan, yaitu metode mikroinjeksi telur dan elektroforasi pada sperma ikan. Penggunaan metode mikroinjeksi telur, umumnya memerlukan peralatan mahal, ketrampilan tinggi dan biaya yang relatif mahal. Sementara metode elektroforasi sperma ikan relatif lebih simpel dan merupakan metode massal penyisipan gen asing ke dalam DNA genom sperma yang selanjutnya dapat membuahi sejumlah telur ikan (Ozato *et al.*, 1991 ; Hackett, 1993 ; Muller *et al.*, 1993) yang dipandang lebih efisien dibanding mikroinjeksi.

Selama dekade terakhir, spermatozoa pada ikan telah banyak diteliti peranannya dan dapat bertindak sebagai vektor untuk transfer gen asing dalam teknologi ikan transgenik yang dikenal sebagai transfer gen yang diperantarai sperma (SMGT = *Sperm Mediated Gene Transfer*) (Collares *et al.*, 2010). Secara alami, hewan akuatik memproduksi sejumlah besar sel-sel sperma yang sangat menguntungkan bagi aplikasi teknik SMGT tersebut. Hasil penelitian Collares *et al.* (2010), menggunakan sperma *American catfish* (*Rhamdia quelen*) yang disisipi konstruksi gen EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), dan difertilisasikan pada telur *catfish* tersebut, transmisi transgen terdeteksi pada larva ikan dengan efisiensi ekspresi transgen sebesar 25 %.

Rekayasa genetika, khususnya teknologi rekombinan DNA mulai banyak diaplikasikan di bidang pembenihan ikan guna meningkatkan pertumbuhan melalui penyisipan gen hormon pertumbuhan tersebut ke dalam DNA genom telur atau sperma ikan. Hormon pertumbuhan (*growth hormone*/GH) merupakan polipeptida penting yang dibutuhkan untuk pertumbuhan secara normal dan perkembangan hewan termasuk ikan. *Growth hormone* adalah suatu kelompok dalam famili hormon yang terdiri dari hormon pertumbuhan (GH), prolaktin (PRL) dan *somatolactin* (SL) (Takayama *et al.*, 1991). Hormon ini disintesis oleh sel somatotrof kelenjar hipofisa untuk menstimulasi produksi faktor-faktor pertumbuhan menyerupai insulin (Baruah *et al.*, 2012) yang memperantarai kebanyakan pengaruh-pengaruh pemacu pertumbuhan.

Tujuan utama yang dikenal luas untuk mengatasi masalah pertumbuhan lambat dalam akuakultur dengan bioteknologi pada dasarnya adalah merekayasa hormon pertumbuhan ikan yang bersangkutan dengan hormon pertumbuhan ikan lain untuk meningkatkan pertumbuhan ikan melalui teknik DNA rekombinan. Sejauh ini telah banyak usaha dilakukan untuk mengatur hormon-hormon pada ikan atau dengan rekombinasi hormon dari mamalia dalam plasmid yang diintegrasikan pada genom ikan sehingga dapat memproduksi hormon dalam jumlah banyak, meningkatkan pertumbuhan dan efisiensi pakan (Chen and Powers, 1990).

Pemberian hormon pertumbuhan alami mamalia ke dalam pakan ikan maupun dengan cara perendaman hormon tersebut ke dalam telur-telur ikan dipandang tidak *efisien*, karena setiap akan memproduksi ikan unggul, pekerjaan harus dilakukan berulang-ulang untuk maksud tersebut. Sebaliknya dengan mengintegrasikan gen asing yang mengekspresikan hormon pertumbuhan ke dalam inti sel ikan dan kemudian dibesarkan sampai induk lebih efisien untuk mewariskan sifat pertumbuhannya pada keturunannya.

Perkembangan metode transfer gen secara massal sangat penting yang memberikan keuntungan pada sistem transfer gen ikan, mengingat tingginya jumlah telur ikan dan fertilisasinya eksternal. Teknologi

DNA rekombinan pada ikan dan sekuen-sekuen regulatorik (sekuen promotor) telah dapat dikloning dan potensial dimanfaatkan untuk pembuatan konstruksi vektor ekspresi yang mengandung gen-gen ikan yang bernilai ekonomis (Muller *et al.*, 1993 ; Dewi dkk., 2010a). Pengujian sekuen-sekuen regulatorik yang dikloning (termasuk sekuen promotor), secara *in vivo* fungsional untuk mempermudah ekspresi transgen yang disisipkan melalui sperma untuk produksi massal ikan transgenik (Alimuddin dkk., 2007 ; Sin *et al.*, 1997). Produksi transgen secara stabil memerlukan waktu dari generasi ke generasi, mengingat tidak 100 % transformasi gen ikan melalui elektroforasi sperma berhasil diwariskan ke telur ikan.

Berlandaskan uraian di atas, bahwa penelitian transfer gen (mengandung sisipan gen GH lele dumbo) pada ikan lele mutiara (*Clarias* sp.) masih terbatas diterapkan, maka diperlukan penelitian transfer konstruksi transgen GH lele dumbo dalam sperma lele mutiara menggunakan teknik elektroforasi sperma.

Bahan dan Metode

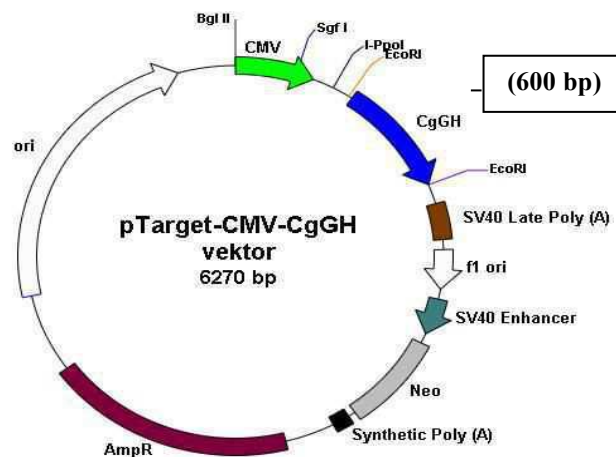
Ikan uji

Induk ikan lele mutiara jantan dan betina matang gonad yang digunakan untuk

penyediaan sperma dan telur lele dalam penelitian transgenesis ini berasal dari Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI) Sukamandi Subang Jawa Barat. Ukuran berat induk jantan maupun betina berkisar 1,5 – 2 kg untuk keperluan sampel sperma dan telur lele dalam pengerjaan elektroforasi.

Konstruksi Gen

Gen yang disisipkan merupakan GH ikan lele dumbo yang diisolasi dari hipofisa ikan dan telah diintegrasikan ke dalam vektor ekspresi pTarget-CMV menjadi konstruksi gen pTarget-CMV-CgGH (Gambar 1). CMV (*cytomegalovirus*) merupakan promotor eukariot sebagai elemen regulatorik gen GH lele dumbo (CgGH). pTarget-CMV ini merupakan vektor ekspresi mamalia komersial yang diproduksi Promega, dan telah digunakan dalam aplikasi transgenesis pada ikan (Martinez *et al.*, 1996). Primer Cg-F (5'-ATGGCTCGAGTTTTGGTGCTGCT-3') dan Cg-R (5'-CTACAGAGTGCAGTTGGAATCCAGGG-3') digunakan untuk mengkopi sekuen GH lele dumbo.



Gambar 1. Konstruksi gen pTarget-CMV-CgGH (6270 bp)
Fig. 1. Construction Gene pTarget-CMV-CgGH (6270 bp)

Teknik Elektroforasi Sperma

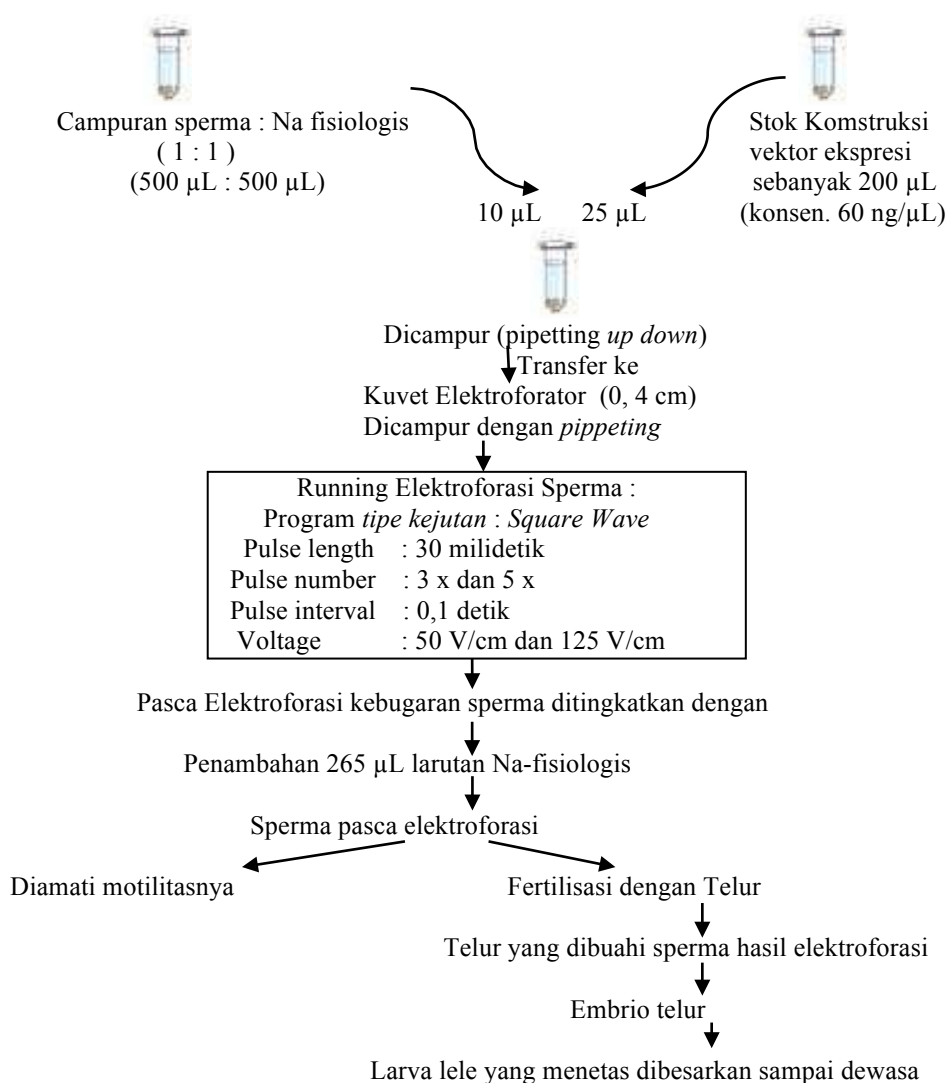
Elektroforasi adalah aplikasi suatu kejutan elektrik pada sel untuk memacu pengambilan

molekul RNA atau DNA dari luar sel masuk ke dalam sel. Prinsip kerja elektroforasi membuka pori-pori sel dengan medan intensitas elektrik tinggi yang secara

temporer mendestabilisasi membran sel (Nakamura, 2009). Selama waktu ini, membran sangat *permeable* dengan molekul-molekul eksogen yang terdapat disekitar media, dan DNA eksogen ini bergerak ke dalam sel melalui lubang *permeable* ini. Ketika medan listrik non aktif, lubang dalam membran menutup dan DNA masuk ke dalam sel.

Konstruksi gen pTarget-CMV-CgGH kemudian dicampur dengan sperma ikan lele dan selanjutnya ditransfer ke dalam kuvet elektroforator. Mesin elektroforasi menggunakan *gen pulser Xcell* (BioRad) dengan metode *square wave* untuk program

kejutan elektrik (*pulse*) dalam pengerjaan transfer gen GH lele dumbo ke dalam sperma lele mutiara. Konsentrasi vektor (pTarget-CMV-CgGH) (mengandung sisipan gen hormon pertumbuhan lele dumbo) yang digunakan 60 ng/ μ L. Kuat medan listrik (voltage) yang digunakan 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa masing-masing 3 dan 5. Lama kejutan 30 milidetik dengan interval pulsa 0,1 detik dan menggunakan kuvet 0,4 cm (Subyakto *et al.*, 2011). Alur teknis pengerjaan elektroforasi transfer GH lele dumbo ke sperma lele mutiara disajikan dalam Gambar 2.



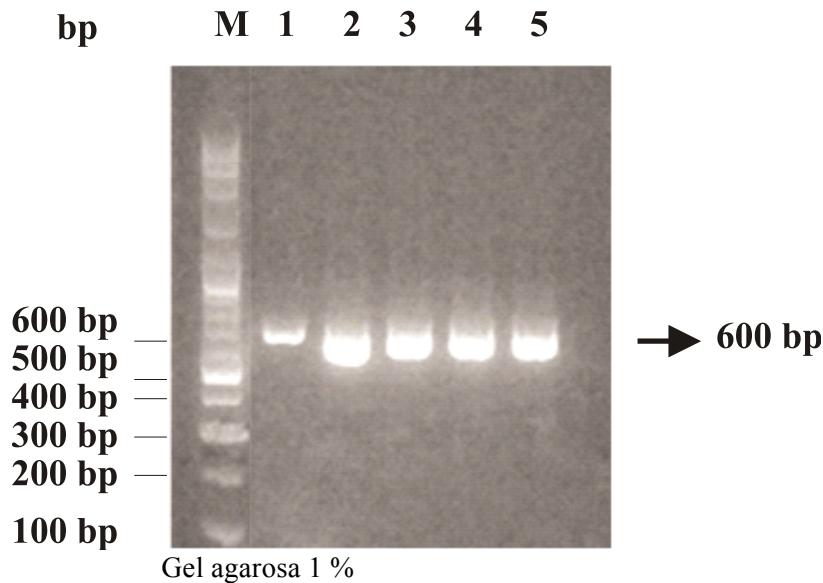
Gambar 2. Pengerjaan transfer pTarget-CMV-CgGH ke sperma lele mutiara
Fig.2. Work on transfer pTarget-CMV-CgGH to mutiara catfish sperm

Hasil dan Pembahasan

Deteksi Sisipan GH Lele Dumbo Pada Sperma Pasca Elektroforasi

Keberadaan sisipan gen hormon pertumbuhan lele dumbo yang ditransformasi ke dalam sel sperma lele mutiara, positif terdeteksi pada sperma berdasarkan analisis PCR (Gambar 3). Ukuran fragmen gen GH sisipan yang terdeteksi sebesar 600 bp pada setiap perlakuan sperma hasil elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa

3 dan 5 (sumur gel ke-2 sampai ke-5 Gambar 3). Fragmen GH lele dumbo (tersisip dalam vektor pTarget-CMV-CgGH) yang terkopi oleh primer Cg-F dan Cg-R juga sebesar 600 bp (kontrol positif). Hasil verifikasi PCR tersebut membuktikan bahwa gen GH lele dumbo telah terintegrasi ke dalam genom sperma lele mutiara dengan teknik elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa 3 dan 5.



Gambar 3. Deteksi GH lele dumbo pada sperma lele mutiara
Fig.3. GH detection African catfish on mutiara catfish sperm

Keterangan :

- M = marker VC 100 bp plus DNA ladder (Vivantis)
- 1 = pTarget-CMV-CgGH (kontrol positif)
- 2 = perlakuan elektroforasi sperma lele mutiara (50 V – jumlah pulsa 3 kali)
- 3 = perlakuan elektroforasi sperma lele mutiara (50 V – jumlah pulsa 5 kali)
- 4 = perlakuan elektroforasi sperma lele mutiara (125 V – jumlah pulsa 3 kali)
- 5 = perlakuan elektroforasi sperma lele mutiara (125 V – jumlah pulsa 5 kali)
- ➡ = fragmen gen hormon pertumbuhan lele dumbo (600 bp)

Berdasar hasil deteksi sisipan GH lele dumbo pada sperma lele mutiara (Gambar 3), menunjukkan bahwa baik voltase maupun jumlah pulsa yang diaplikasikan dalam proses elektroforasi transfer GH lele dumbo ke sperma lele mutiara berhasil masuk dan terintegrasi ke dalam genom sperma lele tersebut. Hasil deteksi keberadaan gen GH lele dumbo yang ditransfer ke dalam sperma lele mutiara ini menunjukkan bahwa sel-sel sperma ikan lebih memungkinkan digunakan sebagai vektor untuk transfer DNA asing melalui elektroforasi. DNA asing ini

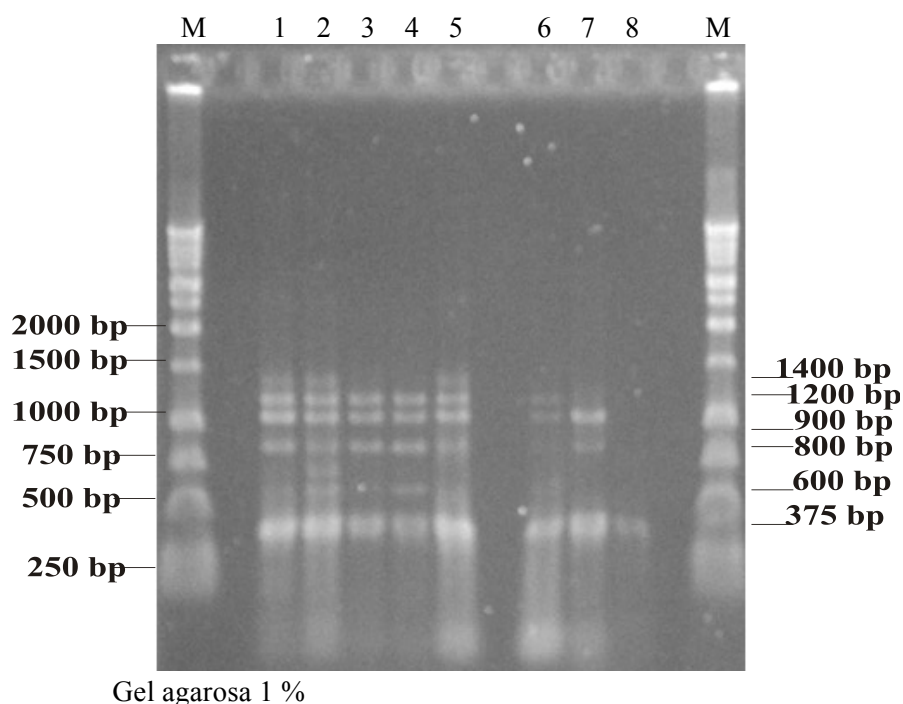
(termasuk pT-CgGH) masuk melalui proses internalisasi DNA oleh sel-sel sperma selama perlakuan elektroforasi (Venogupal and Pandian, 1998). Kuat medan elektrik (voltase) tinggi mempermudah pengambilan DNA asing oleh sel-sel sperma, namun voltase yang terlalu tinggi menyebabkan penurunan motilitas dan kemampuan fertilisasi sperma. Batas voltase optimum yang cukup untuk efisiensi transfer gen ke sperma ikan sebesar 500 V/cm. Berdasar hal ini, pemberian voltase 125 V dan 50 V/cm pada elektroforasi sperma lele mutiara efisien

untuk transfer gen ke dalam sel sperma, dan terbukti fragmen GH lele dumbo terdeteksi oleh primer Cg-F dan Cg-R (Gambar 3). Kombinasi perlakuan voltase dan jumlah pulsa dalam elektroforasi sperma akan memperbesar permeabilitas sel, menyebabkan polinukleotida eksogen (DNA asing) memasuki membran plasma sel sperma (Liu *et al.*, 2011). DNA asing ini lebih lanjut akan dikirimkan kembali oleh sperma ke telur saat fertilisasi yang efektif untuk memproduksi ikan transgenik pembawa fenotip baru skala kecil (Spadafora, 2008; Tsai, 2000). Transgen (pembawa gen GH lele dumbo) dapat ditransmisikan kembali melalui reproduksi seksual dari *parental* (P) ke keturunan pertama (F1) dengan ekspresi fenotip baru.

Keberadaan Gen Pertumbuhan Lele Dumbo Pada Ikan Lele Mutiara Transgenik

Transmisi GH lele dumbo yang berhasil ditransfer sperma ke telur ikan dan terintegrasi dalam genom ikan lele mutiara yang dibesarkan selama pemeliharaan 4 bulan menghasilkan pertumbuhan cepat (*super growth*) pada umur yang sama bila dibandingkan dengan ikan lele mutiara normal (non elektroforasi). Ikan lele mutiara ini merupakan ikan transgenik dengan fenotipe baru, oleh karena memiliki ekspresi peningkatan pertumbuhan melebihi ikan yang normal (*over ekspresi* pertumbuhan). Integrasi dalam hal ini merupakan proses rekombinasi antara molekul DNA transgen dengan molekul DNA kromosom (genom sperma lele mutiara yang menghasilkan kombinasi fenotipe pertumbuhan baru (ikan transgenik) (Spadafora and Lorenzini, 2001).

Pola rekombinasi GH ikan lele mutiara transgenik dan non transgenik seperti yang disajikan dalam Gambar 4, menunjukkan perbedaan jumlah fragmen GH yang terdeteksi pada ikan umur 4 bulan.



Gel agarosa 1 %

Gambar 4. Fragmen GH lele dumbo pada ikan lele mutiara transgenik
Fig.4. GH fragmen African catfish on transgenic mutiara catfish

Pada ikan transgenik (sumur ke-1 sampai ke-7 Gambar 4) untuk semua sampel terdapat fragmen GH lele dumbo (fragmen tersisip pada posisi 1000 bp) dan ikan non transgenik (sumur ke-8 Gambar 4) tidak

terdapat fragmen GH lele dumbo. Hal ini membuktikan bahwa genom ikan transgenik mengandung sisipan GH lele dumbo, sedangkan ikan non transgenik tidak mengandung sisipan GH eksogen yang

menunjukkan keberhasilan transfer GH lele dumbo ke dalam ikan lele mutiara transgenik. Verifikasi dilakukan untuk fragmen yang tersisip pada 1000 bp dengan analisis sekuensing dan penyejajaran sekuen sampel dengan data sekuen yang terdapat pada bank gen menggunakan program *blastN* secara *on-*

line, menunjukkan bahwa sekuen sampel 94 – 98 % identik dengan gen protein GH *Clarias gariepinus* (no. aksesori AF416488.1). Hal ini memperkuat bukti bahwa GH lele dumbo tersisip dalam genom ikan lele mutiara transgenik umur 4 bulan (Tabel 1).

Tabel 1. Kesamaan sekuen sisipan GH sampel dengan GH *C. gariepinus* (no. aksesori AF416488.1)

Table 1. Insertion sequence similarity of GH sample with the GH *C. gariepinus* (no. accession AF416488.1)

Elektroforasi (kode sampel)	Sekuen GH	% identik	No. aksesori
125V/cm-3-1000 bp (1)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	96	<u>AF416488.1</u>
125V/cm-3-1000 bp (2)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	96	<u>AF416488.1</u>
125V/cm-3-1000 bp (3)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	99	<u>AF416488.1</u>
125V/cm-5-1000 bp (4)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	98	<u>AF416488.1</u>
125V/cm-5-1000 bp (5)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	94	<u>AF416488.1</u>
50V/cm-3-1000 bp (6)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	95	<u>AF416488.1</u>
50 V/cm-5-1000 bp (7)	<i>Gen protein GH C. gariepinus</i>	95	<u>AF416488.1</u>
NT-375 bp (8)	<i>Clarias batrachus mitochondrion</i> , complete genome	35	<u>KC572134.1</u> (bukan GH lele dumbo)

Kemiripan yang tinggi sekuen GH sampel dengan GH *C. gariepinus* pada bankgen ini (Tabel 1), memperkuat bukti bahwa GH sampel yang terdeteksi dalam genom ikan lele mutiara transgenik (perlakuan elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/vm dengan jumlah pulsa 3 dan 5) adalah GH lele dumbo (merupakan keturunan *African catfish*, *C. gariepinus*). Sementara GH lele dumbo tidak terdeteksi pada ikan mutiara non transgenik (non elektroforasi), oleh karena fragmen 375 bp yang terkopi primer Cg-F dan Cg-R bukan merupakan GH lele dumbo (Tabel 1).

Fragmen DNA yang terkopi oleh primer Cg-F dan Cg-R baik pada ikan lele mutiara transgenik (perlakuan elektroforasi) dan ikan lele mutiara non transgenik (tanpa perlakuan elektroforasi) menunjukkan pola sisipan yang berbeda (Gambar 4). Perbedaan ini menyiratkan perbedaan situs integrasi gen GH lele dumbo (GH eksogen) dalam genom ikan lele mutiara transgenik yang diindikasikan dengan terkopinya fragmen DNA dengan jumlah yang berbeda oleh

primer tersebut (Tabel 2). Sebaliknya pada genom ikan lele mutiara non transgenik (kontrol), hanya terkopi 1 fragmen DNA oleh primer Cg-F dan Cg-R.

Hasil yang disajikan pada Tabel 2, menunjukkan bahwa jumlah fragmen GH eksogen (GH lele dumbo) yang masuk dan terintegrasi ke dalam genom ikan lele transgenik dengan bantuan kejutan elektrik (elektroforasi) berbeda-beda tergantung dari voltase dan jumlah pulsa yang diberikan. Pemberian kejutan elektrik 125 V/cm dengan jumlah pulsa 3, sisipan fragmen GH eksogen pada ikan nomor 1 dan 2 masing-masing berjumlah 7, dan pada ikan nomor 3 berjumlah 4 fragmen. Sebaliknya pada kejutan 125 V/cm dengan jumlah pulsa 5 (ikan nomor 4 dan 5), menghasilkan masing-masing 4 fragmen GH eksogen. Pada kejutan elektrik 50 V/cm dengan pulsa 3 dan 5, masing-masing jumlah fragmen sisipan GH eksogen sebanyak 4 fragmen (Tabel 2). Khusus pada ikan lele non transgenik hanya terdeteksi 1 fragmen DNA.

Tabel 2. Jumlah kopi fragmen DNA oleh primer Cg-F dan Cg-R pada lele transgenik dan non transgenik

Table 2. Number of DNA fragment copies by Cg-F and Cg-R primer on transgenic and non-transgenic catfish

Ikan nomor	Jumlah fragmen DNA	Posisi sisipan fragmen GH (bp)
1	7	375, 600, 750, 800, 1000, 1200, 1400
2	7	375, 600, 750, 800, 1000, 1200, 1400
3	4	375, 800, 1000, 1200
4	5	375, 600, 800, 1000, 1200
5	6	375, 600, 800, 1000, 1200, 1400
6	4	375, 600, 1000, 1200
7	4	375, 800, 900, 1000
8	lele non transgenik	375

Posisi fragmen GH yang terintegrasi pada genom ikan lele transgenik bervariasi letaknya dari setiap pemberian kejutan 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa 5 dan 3 (Tabel 2). Hasil ini mirip dengan penelitian Hostetler *et al.*, (2003) dan Fletcher *et al.*, (2002), bahwa transgen dapat terintegrasi pada banyak lokus kromosom, dan pola integrasinya bersifat acak. Integrasi DNA asing (dalam hal ini GH eksogen) merupakan kejadian independen, dan jumlah transgen yang terkopi tergantung dari jumlah transgen yang berhasil masuk dan bergabung dengan DNA genom inang saat proses elektroforasi. Kejutan elektrik 125 V/cm dengan jumlah pulsa 3 menghasilkan fragmen sisipan GH eksogen terbanyak (7 fragmen) dibanding 50 V/cm, memberikan peluang besar transgen masuk ke dalam sperma. Jumlah pulsa (5 dan 3) yang dikombinasikan dengan voltase 125 V/cm dan 50 V/cm, tidak memberikan pengaruh besar terhadap jumlah sisipan GH eksogen yang masuk ke dalam genom lele transgenik, hanya voltase kejutan elektrik yang berpengaruh besar terhadap peningkatan jumlah sisipan GH eksogen yang masuk ke genom ikan.

Over Ekspresi Pertumbuhan Ikan Lele Mutiara Transgenik

Meningkatnya jumlah sisipan GH lele dumbo ke dalam genom ikan lele mutiara mengakibatkan *over ekspresi* pertumbuhan ikan lele transgenik tersebut (Lampiran 1A –

1E). Dua ekor ikan lele transgenik (strain Mutiara) hasil elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/cm dengan pulsa 3 dan 5, tumbuh besar dan ukurannya di atas rata-rata ikan lele non transgenik dalam bak pemeliharaan yang sama. Ukuran ikan lele transgenik ini 2-3 kali lebih besar dibanding ukuran ikan lele non transgenik. Hal ini mengindikasikan bahwa konstruksi gen (pTarget-CMV-GH lele dumbo) yang ditransformasikan ke sperma lele mutiara berhasil masuk ke sperma, kemudian transgen mendorong ekspresi hormon pertumbuhan eksogen (GH lele dumbo) sehingga pertumbuhan lele mutiara transgenik menjadi berlipat ganda (diinduksi oleh GH endogen dan GH eksogen) bila dibandingkan lele mutiara yang tidak membawa transgen (non elektroforasi). Pertumbuhan yang dramatis pada ikan transgenik ini membuktikan adanya efek pertumbuhan *gigantisme* dimana pertumbuhan ikan melebihi pertumbuhan ikan lele non transgenik pada umur pemeliharaan yang sama. Lampiran 1A sampai 1E di bawah ini memperlihatkan pertumbuhan ikan lele mutiara transgenik pada umur 4 bulan, dimana pertumbuhannya 2-3 kalinya dari pertumbuhan ikan non transgenik (ikan yang tidak membawa konstruksi gen).

Hasil pengukuran berat ikan lele transgenik dan non transgenik, khususnya ikan yang besar menunjukkan rata-rata pertumbuhan ikan lele transgenik 2 – 3 kali pertumbuhan ikan lele non transgenik (Tabel 3).

Tabel 3. Berat ikan lele transgenik dan non transgenik (g) umur 4 bulan
Table 3. Weight of transgenic and non-transgenic catfish (g) aged four months

Nomor Ikan	Elektroforasi transfer GH lele dumbo (transgenesis)				
	125 V/cm – 3	125 V/cm - 5	50 V/cm – 3	50 V/cm – 5	NT
1	275	470	250	315	100
2	410	370	300	370	95
3	1265*	240	250	364	140
4	495	260	275	255	65
5	475	460	325	475	60
6	250	1159*	250	265	165
7	320	265	260	290	115
8	440	235	485	205	379*
9	375	340	280	250	135
10	435	290	1012*	915*	85
Rata-rata	474	408,9	368,7	369,4	133,9
Kelipatan tumbuh dari non transgenik (NT)	3,53 kali	3,05 kali	2,75 kali	2,76 kali	

Keterangan : * = ikan dengan berat tertinggi

125 V/cm – 3 = elektroforasi 125 V/cm dengan jumlah pulsa 3

125 V/cm – 5 = elektroforasi 125 V/cm dengan jumlah pulsa 5

50 V/cm – 3 = elektroforasi 50 V/cm dengan jumlah pulsa 3

50 V/cm – 5 = elektroforasi 125 V/cm dengan jumlah pulsa 5

NT = non transgenik (non elektroforasi)

Ukuran berat ikan terbesar pada hasil elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa 3 dan 5 (ikan transgenik) masing-masing 1265 g, 1159 g, 1012 g dan 915 g (Tabel 3). Kelipatan tumbuh rata-rata dari 10 ikan sampel lele transgenik sebesar 3,53 kali; 3,05 kali; 2,75 kali dan 2,76 kali dari ukuran rata-rata ikan non transgenik. Sementara untuk kelipatan tumbuh ikan transgenik paling berat (*) masing-masing sebesar 3,34 kali, 3,06 kali, 2,67 kali dan 2,41 kali ukuran berat ikan lele non transgenik tertinggi (379 g) (Tabel 3). Bukti ini menunjukkan bahwa konstruksi gen (pTarget-CMV-CgGH) yang mengandung GH lele dumbo dan disisipkan ke ikan lele mutiara menghasilkan ikan transgenik dengan pertumbuhan berlipat (*super growth*) dibanding ikan non transgenik. Hasil penelitian transfer gen GH patin siam dalam konstruksi gen pCcBA-PhGH ke dalam sperma patin melalui teknik elektroforasi, menunjukkan bahwa tingkat transmisi gen tersebut dari generasi F0 (*parental*) ke generasi F1 sebesar 66,7 % dan selama 4 bulan pemeliharaan, populasi F1 patin transgenik tumbuh 47,5 % lebih cepat

dibanding ikan patin non transgenik (Dewi dkk., 2014). Penelitian lain juga membuktikan *over ekspresi* pertumbuhan ikan *Atlantic salmon* (*Salmo salar*) transgenik memiliki kelipatan tumbuh sebesar 2,85 kali dari ikan non transgenik (Cook *et al.*, 2000). Dengan demikian hal ini memperkuat bukti bahwa efek *gigantism* dari pertumbuhan ikan lele mutiara transgenik merupakan *over ekspresi* GH lele dumbo sebagai ekspresi fenotip baru ikan lele transgenik.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Deteksi sisipan GH lele dumbo terkandung dalam genom sperma dan ikan lele mutiara transgenik (elektroforasi 125 V/cm dan 50 V/cm dengan jumlah pulsa 3 dan 5) umur 4 bulan
2. Rata-rata kelipatan tumbuh ikan lele mutiara transgenik hasil elektroforasi 125 V/cm-pulsa 3, 125 V/cm-pulsa 5, 50 V/cm-pulsa 3 dan 50 V/cm-pulsa 5 berturut-turut 3,53 kali; 3,05 kali; 2,75

kali dan 2,76 kali dari ukuran ikan non transgenik.

Saran

Guna mengetahui tingkat pewarisan GH lele dumbu pada keturunan F1 ikan lele mutiara transgenik diperlukan uji persilangan keturunan F0 dengan F1 dan deteksi GH lele dumbu dengan PCR pada keturunan F1.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Bapak Direktur Jenderal Pembelajaran Dan Kemahasiswaan, Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi Dan Pendidikan Tinggi dan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat UNPAD beserta jajarannya yang telah membiayai penelitian ini dengan Dana DP2M Kemenristek Dikti Tahun 2015. Demikian pula diucapkan terima kasih kepada tim peneliti serta semua pihak yang telah membantu penelitian hingga selesai.

Daftar Pustaka

- Alimuddin, W. Nugrahani, R.S. Aliah, K. Sumantadinata, I. Faizal, O. Carman dan G.Yoshizaki. 2007. Isolasi dan karakterisasi promotor β -actin dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Riset Akuakultur* 2 (2): 199 – 209.
- Baruah, C., U.C. Goswami, and D.K. Sharma. 2012. *In Silico* characterization of growth hormone from freshwater ornamental fishes: Sequence analysis, molecular modelling and phylogeny. *African Journal of Biotechnology* 11(31): 8005 – 8021.
- Chen, T.T. and D.A. Powers. 1990. Transgenic fish. *Trends Biotechnol.* 8 : 209 – 215. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of total RNA isolation by a single extraction with an acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162 : 156 – 159.
- Collares, T., V.F. Campos, F.K. Seixas, P.V. Cavalcanti, O.A. Dellagostin, H.L.M. Moreira, J.C. Deschamps. 2010. Transgene transmission in South American Catfish (*Rhamdia quelen*) Larvae by Sperm-Mediated Gene Transfer. *J. Biosci.* 35 (1): 1-9.
- Cook, J.T., M.A. McNiven, G.F. Richardson, and A.M. Sutterlin. 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility / conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188 : 15-32.
- Dewi, R.R.S.P.S., Alimuddin, A.O. Sudradjat, K. Sumantadinata. 2010a. Optimal electroporation condition for sperm mediated gene transfer in Stripped Catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Indonesian Aquaculture Journal* 5 (1): 1-10.
- Dewi, R.R.S.P.S., J. Darmawan, dan I. Nurlaela. 2014. Transmisi dan ekspresi fenotipe gen penyandi hormon pertumbuhan pada ikan patin siam. *J. Ris. Akuakultur* 9 (1): 31-37.
- Fletcher, G.L., M.A. Shears, M.J. King, S.V. Goddard. 2002. *Transgenic salmon for culture and consumption*. <http://www.heb.pac.dfomp.gc.ca/congress/2002/biochem/fletcher.pdf>. Diakses tanggal 26 April 2012.
- Hackett, P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish. In: Hochacha and Mommessen (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes I* 2: 218-221.
- Hostetler, H.A., L.P. Stephanie, and W.M. Muir. 2003. High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Research* 12 : 413-424.
- Liu, T., L. Liu, Q. Wei, and Y. Hong. 2011. Sperm nuclear transfer and transgenic production in the fish medaka. *International Journal of Biological Sciences* 7 (4) : 469-475.

- Morales, A. Morales, P. Melamed, R. Leionart, and J de la Fuente. 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5 (1) : 62 – 70.
- Muller, F., L. Zsolt, V. Laszio, M. Lazsio and O. Laszio. 1993. Efficient transient expression system based on square pulse electroporation and in vivo luciferase assay of fertilized fish eggs. *Federation of European Biochemical Societies* 324(1): 27-32.
- Nakamura, H. 2009. *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology*. Springer Tokyo Berlin Heidelberg New York. 335p.
- Ozato, K., H. Inohara, T. Iwamatsu, Y. Wakamatsu and T.S. Okada. 1991. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken σ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.* 19 : 237-244.
- Spadafora, C. 2008. Sperm mediated 'reverse' gene transfer : a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Huma Reproduction*. Pp. 735-740.
- Spadafora, C., and R. Lorenzini. 2001. Sperm-Mediated Transgenesis: Practical Implications of a Biological Process. *Graft* 4: 68-71.
- Sumantadinata. 2011. Comparison of three different techniques of gene transfer in humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Biotropia* 18 (1) : 13 – 23.
- Takayama, Y., M. Tanaka., M. Ushiro, Y. Yonada and K. Nakashima. 1991. Synthesis of recombinant yellowtail and flounder growth hormone in *E. coli*. *Biosci.,Biotech.,Biochem.* 56 : 1012 – 1016.
- Tsai, H. J. 2000. Electrophorated sperm mediation of gene transfer system for finfish and shellfish. *Molecular Reproduction and Development* 56 : 281-284.