

**AKTIVITAS GEN GREEN FLOURESCENT PROTEIN SEBAGAI REPORTER
GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)**

**ARTIKEL SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh:
SAIFUL BAKHRI
NIM. 0510850056



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2011

**AKTIVITAS GEN GREEN FLOURESCENT PROTEIN SEBAGAI REPORTER
GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)**

Artikel Skripsi

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana

Oleh :

SAIFUL BAKHRI

NIM. 0510850056



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2011

**AKTIVITAS GEN GREEN FLOURESCENT PROTEIN SEBAGAI REPORTER
GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)**

Oleh:
SAIFUL BAKHRI
NIM. 0510850056

Menyetujui

Dosen Pembimbing I
II

Dosen Pembimbing

(DR.Ir. Abdul Rahem Faqih, MS)
M.Aqua)
NIP. 19671010 199702 1 001
2 002
Tanggal :

(Ating Yuniarti, Spi,
NIP. 19750604 199903
Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1001
Tanggal :

AKTIFITAS GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI REPORTER GEN PADA SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti*)

Saiful Bakhri¹, DR. Ir. Abdul Rahem Faqih, MS², Ating Yuniarti, Spi. M.Aqua²

ABSTRAK

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kuat medan listrik 40 V/cm dengan konsentrasi GFP 60 ng/μl, lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (viabilitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan nilem (*Osteochilus hasselti*). Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK), dilakukan dengan 2 uji faktor. Faktor pertama, lama kejutan (*pulse length*) 0,5 ms dan 1 ms. Faktor kedua, jumlah kejutan 2x, 4x dan 6x.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa perlakuan lama kejutan (*Pulse length*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) memberikan hasil yang berbeda nyata terhadap motilitas, mortalitas, fertilitas dan daya tetas tetapi tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap integrasi GFP ke inti sperma. Sedangkan pengamatan integrasi GFP terlihat, semua sel sperma perlakuan, hasil persentase integrasi GFP pada inti sperma dengan nilai tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 53,25%. Transfer GFP dengan metode elektroporasi menghasilkan pendaran intensitas sperma tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 1900 *arbitrary*, pada embrio nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 3950 *arbitrary* serta larva nilai tertinggi sebesar 3300 *arbitrary* pada kepala dan perut, sedangkan pada bagian ekor sebesar 2300 dengan perlakuan 0,5 ms 6x.

Pada pengamatan dibawah mikroskop konvokal diketahui bahwa promoter β-actin medaka efektif dalam mengekspresikan GFP sebagai gen target. Sedangkan kualitas air media penetasan telur berada dalam kondisi normal. Untuk kualitas air, nilai suhu sebesar 27-30 °C, pH 7,61 sedangkan DO sebesar 4,42 sampai 5,80 mg/l.

Kata kunci: Ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), Protein Berpendar Hijau (GFP), elektroporasi

THE ACTIVITY OF GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) GENE AS REPORTER GEN INTO SPERM OF NILEM FISH (*Osteochilus hasselti*)

Saiful Bakhri¹, DR. Ir. Abdul Rahem Faqih, MS², Ating Yuniarti, Spi. M.Aqua²

ABSTRACT

The purpose of this research is to know the effect of voltase 40 V/cm within concentration 60 ng/μl, pulse lenght and pulse number to motility, viability, fertility with ekspression of GFP gene into sperm, embryo, and larvae nilem fish (*Osteochilus hasselti*). Plan of research who applied in this research is Plan of Group Random (RAK), it does wit two factor test. First factor, pulse lenght 0,5 ms and 1 ms. Second factor, pulse number 2x,4x and 6x.

On teh strenght of research result. It knowing that the treatment of pulse lenght and pulse number give result real different to motility, mortility, fertility and haching rate. But not give influence real different to GFP integration into sperms nucleus. Whereas monitoring of GFP integration is visible, all of treatment sperms cell with high result at the treatment 0,5 ms 6x as a big as 53,25% , whereas GFP transfer due electroporation method Transfer GFP produce intensity of flourescence high sperm at the treatment 0,5 ms 6x as big as 1900 *arbitrary*, on embryo high result happen at treatment 0,5 ms 4x as big as 3950 *arbitrary*, alog with high result on larvae asbig as 3300 *arbitrary* on head and womb, whereas on part of tail as big as 2300 *arbitrary* due treatment 0,5 ms 6x

At monitoring under convocal microscopy is knowing that promoter β-actin medaka is effective to ekspression GFP asn target gene. Then, hatching eggs water quality on normaly condition. For water quality, temperature beetwen 27-30 °C, pH 7,61 and then DO as big as 4,42 until 5,80 mg/ml.

Keyword : Nilem fish (*Osteochilus hasseltii*), Green Flourescent Protein (GFP), electroporation

Keterangan:

1. Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
2. Staf pengajar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyediaan bahan pangan merupakan masalah yang terus-menerus diupayakan pemecahannya untuk kesejahteraan manusia, salah satunya melalui pembangunan perikanan, yaitu melalui berbagai terobosan untuk meningkatkan hasil perikanan. Salah satu jenis ikan konsumsi yang berpeluang untuk dibudidayakan adalah ikan nilam (*Osteochilus hasselti* C.V). (Agung et al., 2007). Sedangkan menurut Hardjamulia (1979), salah satu hambatan yang umum dialami dalam budidaya ikan adalah tidak tersedianya benih yang cukup dan berkesinambungan. Beberapa permasalahan perikanan budidaya ikan tersebut dapat diatasi dengan penerapan bioteknologi melalui rekayasa genetika.

Menurut Anonymous (2009a), saat ini, produk bioteknologi telah merasuki kehidupan sehari-hari yang mungkin jauh melebihi dari yang kita bayangkan sebelumnya. Bioteknologi didefinisikan sebagai manipulasi dan rekayasa genetika terhadap sistem atau proses biologi berdasarkan prinsip-prinsip ilmiah dengan bantuan agen biologi (Anonymous, 2009b). Sehingga, rekayasa genetika merupakan tindakan untuk memanfaatkan gen atau DNA dari suatu organisme untuk keperluan manusia dengan melalui transfer gen.

Kesuksesan transfer gen pertama kali tentang perikanan pada tahun 1985 di Cina (Zhu et al., 1985). Dan (Palmiter dan Brinster, 1985), mendefinisikan teknologi transgenik pada ikan atau hewan ternak pada umumnya adalah memasukkan DNA rekombinan yang telah dikendalikan ke dalam genom, sehingga DNA yang dimasukkan ini dapat mengembangkan salah satu aspek dari produktivitas, juga DNA dan efeknya dapat diturunkan kepada anaknya. Menurut Rustidja (2002), elektroporasi adalah metode yang menggunakan serangkaian getaran elektrik pendek untuk melarutkan membran sel, dengan demikian molekul DNA dapat masuk ke dalam sel. Gagne *et al.*, (1991) menambahkan, karena dengan elektroporasi pembuahan telur dapat menghasilkan jumlah 10 hingga 100 kali lebih besar daripada mikroinjeksi.

Brackett di Amerika Serikat pada sisi lain telah menemukan metode sperma sebagai media transfer gen sebagai suatu metode baru untuk produksi hewan transgenik. Karena spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit (Handarini, 2004).

Menurut Tsai (2000), beberapa manfaat dalam penerapan sperma sebagai media teknik transfer gen pada ikan, salah satunya adalah sperma sebagai pelapor vektor dalam memasukkan DNA asing untuk menghasilkan ikan transgenik. Salah satu yang biasanya digunakan untuk

reporter gen adalah Green Flourescent Protein (GFP) (Heim *et al.*, 1994). Dan kemungkinan besar digunakan sebagai reporter gen pada sel hidup. Jadi, dibandingkan dengan reporter gen yang lain, GFP ini stabil, tidak membutuhkan substrat atau uji protein untuk menghasilkan pendaran hijau (Heim *et al.*, 1994). GFP diperoleh dari Ubur-ubur (Chalfie *et al.*, 1994). GFP merupakan protein yang mengandung asam amino 238 (26,9 KDa) dari spesies ubur-ubur *Aequorea victoria*. Protein GFP menyerap cahaya biru pada puncak panjang gelombang maksimum 395 nm dan minimum 470 nm. Pada umumnya promoter yang dipakai untuk GFP fusion adalah 35S sehingga konstruk akhir menjadi p35S:gen/cDNA:GFP. Ekspresi yang muncul tersebut sering disebut dengan transient expression (ekspresi sementara) dari suatu gen (Anonymous, 2009c).

Salah satu hal yang penting dalam kegiatan transgenesis GFP pada sperma ikan nilem adalah pemilihan promoter yang berperan mengatur waktu dan lokasi dimana gen asing yang dimasukkan dapat aktif dan berekspresi. Promoter ada yang bekerja pada jaringan spesifik dan ada pula yang bekerja pada semua jaringan (Hacket, 1993). Promoter merupakan salah satu faktor penentu dalam teknologi transgenesis (Fariduddin, 2009). Menurut (Alimuiddin, 2009), promoter sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah

satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Promoter yang digunakan pada penelitian ini adalah β -actin medaka, karena memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot.

1.2 Perumusan Masalah

- Bagaimana pengaruh kuat medan listrik 40 (V/cm), lama kejutan (*pulse length*) 0,5 ms dan 1 ms, serta jumlah kejutan (*pulse number*) 2x, 4x, 6x terhadap integrasi gen α - β -Actin – hrGFP pada sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti*)?
- Apakah GFP dengan promoter *Beta actin medaka* bisa terkespresi pada sperma, embrio dan larva ikan nilem (*Osteochillus hasselti*)?

1.3 Tujuan penulisan

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kuat medan listrik 40 V/cm, lama kejutan (*Pulse Length*) dan jumlah kejutan (*Pulse Number*) terhadap pergerakan (motilitas) sperma, kemampuan hidup (viabilitas) sperma, kemampuan sperma membuahi telur (fertilitas) serta gambaran ekspresi gen GFP pada sperma, embrio dan larva ikan nilem (*Osteochilus hasselti*).

2. MATERI DAN METODOLOGI

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: 1 set alat *Gene Pulser Xcell*TM merk BIO-RAD yang terdiri atas mesin elektroporator, shock pod dan cuvet, mikroskop konvokal (Convocal Laser Scanning Microscope/CLSM) merk

Olympus *flowview* versi 1.7a, mikroskop Olympus BX 51 tipe Inverted, mikroskop biokuler merk Olympus CX21, timbangan, penggaris, cawan petri, mangkuk plastik, spuit 5 ml, sectio set, akuarium, bak pemeliharaan induk, wadah, bak plastik, seser, serbet, pisau, handuk, botol film, nampan, mikropipet, appendorf, pipet tetes, Blue tip, yellow tip, kamera digital, obyek glass, cover glass, pH meter, DO meter, Termometer, *handtally counter*, *haemocytometer*, aerator, dan instalasi aerator.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi: induk ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), ovaprim larutan fisiologis, HSN-hrGFP, eosin negrosin, tissue, kapas, alkohol 70%, PI (*propidium iodine*), gliserin, cat kuku, larutan PBS, Aluminium Foil, aquadest.

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Rancangan Acak Kelompok adalah suatu rancangan dasar yang menggunakan pengawasan setempat dengan pembatasan pengacakan atau merupakan suatu rancangan dimana suatu lingkungan percobaan dikelompokkan sedemikian rupa, sehingga terdapat homogenitas maksimum dalam setiap kelompok dan minimum antar kelompok (Yitnosumarno, 1993). Data hasil penelitian di analisa dengan menggunakan program SPSS 16. Data dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat bersifat tidak normal akibat adanya

variasi yang timbul akibat perlakuan. Karena itu data diuji kenormalannya dengan uji Kolmogorof-Smirnov (Dude dan Satya, 1995). Selanjutnya di uji melalui *analysis of variance* (UNIANOVA). Dari hasil tersebut akan diperoleh nilai *sig.* dan selanjutnya dibandingkan dengan α (5%), apabila nilai *sig.* lebih kecil dari α maka diterima H_1 atau ditolak H_0 , begitu pula sebaliknya (Hanafiah, 1993).

Sehingga dilakukan dua kali tahap percobaan, yang pertama adalah pengujian *Pulse length* 0,5 ms dengan 3 level kejutan dan kedua pengujian *Pulse length* 1 ms dengan 3 level kejutan. Penelitian ini digunakan kuat medan listrik 40 V/cm dan konsentrasi GFP 60 ng/ μ L, sehingga masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut :

A1B1	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 2x
A1B2	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 4x
A1B3	→	Pulse Length 0,5 ms + pulse number 6x
A2B1	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 2x
A2B2	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 4x
A2B3	→	Pulse Length 1 ms + pulse number 6x

Pada penelitian ini juga dilakukan dua kali kontrol (tanpa perlakuan), yaitu :

- K1 = sperma sebelum perlakuan
- K2 = sperma sesudah perlakuan

Motilitas sperma yaitu pergerakan spermatozoa, sedangkan viabilitas yaitu kemampuan hidup dari spermatozoa. Cara pengamatan motilitas dan viabilitas sperma sebelum dan sesudah perlakuan sama. Pengamatan motilitas sperma dilakukan dengan mengambil sejumlah sperma lalu ditetaskan pada obyek glass kemudian ditetesi dengan aquades. Setelah itu diamati pergerakan sperma dan ditentukan motilitas massal dan individu.

- Motilitas massal, ditentukan berdasarkan jenis pergerakannya (*fast progressive, non-progressive, atau immotile*).
- Motilitas individu, ditentukan berdasarkan jumlah sperma yang bergerak dan yang tidak (dalam %).

Pengamatan viabilitas sperma bertujuan untuk mengetahui jumlah sperma yang hidup dan yang mati. Caranya adalah dengan menetaskan sejumlah sperma dalam obyek glass kemudian diberikan pewarna eosin negrosin dan di smear dengan cover glass. Menurut Toelihere (1985) pewarnaan semen digunakan untuk membedakan sperma yang hidup dan yang mati. Zat warna yang umum dipakai adalah eosin atau merah kongo terhadap latar belakang hitam dari negrosin. Setelah pewarnaan eosin pada obyek glass kering, selanjutnya ditentukan persentase viabilitas sperma dengan menghitung jumlah sperma yang hidup (berwarna bening) dan sperma yang mati (berwarna kemerahan) menggunakan *handtally counter* secara bersamaan. Nilai

persentase viabilitas sperma dihitung dengan rumus: % Viabilitas sperma =

$$\frac{\sum \text{spermahidup}}{\sum \text{totalsperma}} \times 100\%$$

Setelah sperma dielektroporasi sebagian sperma diamati dalam mikroskop konvokal, sedangkan sisanya untuk difertilisasi pada telur. Sperma yang akan diamati diletakkan pada obyek glass dan kemudian diamati ekspresinya dibawah mikroskop konvokal. Sperma yang terintegras GFP akan berpendar hijau. Setelah itu dihitung jumlah sperma yang berpendar dibawah mikroskop konvokal pada satu bidang pandang menggunakan *handtally counter* dan ditentukan persentase sperma membawa transgen (PSMT) dengan rumus :

$$\text{PSMT} = \frac{\sum \text{Sperma Terintegrasi GFP sampai ke inti}}{\sum \text{telur total}} \times 100\%$$

Selain perhitungan persentase sperma yang terbawa transgen, diamati pula letak integrasi gen GFP serta sebaran dan intensitasnya.

Sperma hasil elektroporasi kemudian difertilisasikan dengan telur. Fertilisasi dilakukan dengan mencampurkan sperma transgen dengan 0,25 gr telur dengan jumlah ± 174 butir. Jumlah ini dirasa ideal untuk mewakili dan memudahkan pengamatan. Setelah telur dan sperma dicampurkan kemudian diberikan aquades (untuk mengaktifkan sperma) dan diaduk perlahan. Setelah dihitung derajat fertilisasi dengan rumus :

Derajat Fertilisasi (DF) =

$$\frac{\Sigma \text{ telur terbuahi}}{\Sigma \text{ telur total}} \times 100\%$$

Telur hasil fertilisasi diamati dibawah mikroskop konvokal. Tujuannya untuk mengetahui apakah telur hasil fertilisasi tersebut tersisipi GFP atau tidak. Caranya dengan mengambil 5-10 butir telur yang terbuahi secara acak sebagai sampel dan kemudian diamati di mikroskop konvokal. Kemudian diamati letak pendarannya dan dibandingkan dengan telur kontrol,. Selanjutnya dihitung persentase embrio pembawa transgen dengan rumus:

$$\text{Persentase Embrio Membawa Transgen (PEMT)} = \frac{\Sigma \text{ embrio transgen}}{\Sigma \text{ embrio sampel}} \times 100\%$$

Setelah menetas, ekspresi gen pada larva juga perlu diamati. Dengan melakukan pengamatan ekspresi gen pada larva maka dapat diketahui apakah gen GFP masih terekspresi pada larva atau tidak. Pengamatan larva transgen dilakukan dengan menggunakan mikroskoop konvokal serta diamati pula letak integritasnya pada larva. Kemudian dihitung persentase larva pembawa transgen dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase larva pembawa transgen (PLMT)} = \frac{\Sigma \text{ Larva transgen}}{\Sigma \text{ embrio sampel}} \times 100\%$$

Parameter penunjang dalam penelitian ini yaitu :

- Perubahan nilai motilitas dan viabilitas sperma

• Derajat fertilisasi (DF) =

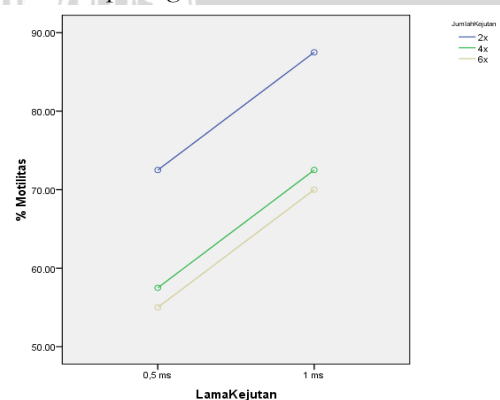
$$\frac{\Sigma \text{ telur terbuahi}}{\Sigma \text{ telur total}} \times 100\%$$

• Derajat Penetasan (DP) =

$$\frac{\Sigma \text{ telur menetas}}{\Sigma \text{ telur terbuahi}} \times 100\%$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan motilitas sperma perlakuan dilakukan untuk memperlihatkan kondisi sperma setelah di elektroforasi dengan jumlah dan lama kejutan yang telah diatur. Dari hasil perhitungan persentase motilitas, persentase motilitas tertinggi terdapat pada perlakuan 1 ms 2x dengan persentase sebesar 85%. Sedangkan motilitas terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x dan 0,5 ms 6x dengan persentase 55%. Grafik analisa bisa diamati pada gambar 1 dibawah:



Gambar 1 : Motilitas Sperma Ikan Nilem

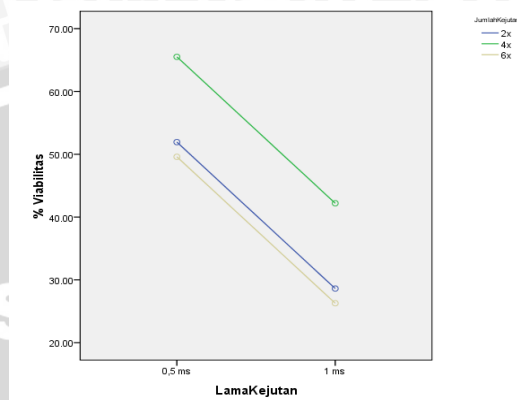
Dari hasil sidik ragam motilitas sperma ikan nilem hasil elektroporasi,

menunjukkan bahwa perlakuan Lama Kejut (*Pulse Length*) memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap motilitas sperma ikan nilam (*Osteochilus hasselti*) dengan nilai Sig. (0,011) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sedangkan pemberian lama kejutan (*Pulse Number*) juga memberikan pengaruh berbeda nyata, dengan nilai Sig. (0,029) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 .

Hasil analisa di atas menunjukkan pengaruh jumlah kejutan dan lama kejutan mempengaruhi motilitas sperma, karena pada hasil yang diperoleh, persentase motilitas mengalami kenaikan pada kisaran lama kejutan antara 0,5 ms hingga 1 ms dengan jumlah kejutan yang lebih rendah. Rols dan Justin (1998) mengatakan bahwa durasi kejutan listrik yang lebih panjang memiliki efisiensi permeabilisasi yang lebih tinggi serta banyaknya jumlah kejutan dapat mengontrol penyerapan makromolekul ke dalam sel sehat, meski dalam durasi (lama) kejutan yang singkat.

Hubungan viabilitas sperma dengan mortalitas berbanding terbalik, karena semakin rendah nilai mortalitas maka nilai viabilitas semakin tinggi. Pengamatan viabilitas (daya tahan hidup) sperma dilakukan dengan cara mencatat waktu mulai bergerak lamban, bergerak berputar ditempat (*reservoir*), berdenyut lemah sampai tidak berdenyut lagi atau mati. Viabilitas tertinggi sperma ikan nilam

terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 64,99 %. Sedangkan persentase yang terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 2x sebesar 20,85%.



Gambar 2. Viabilitas Perlakuan Sperma Ikan Nilam

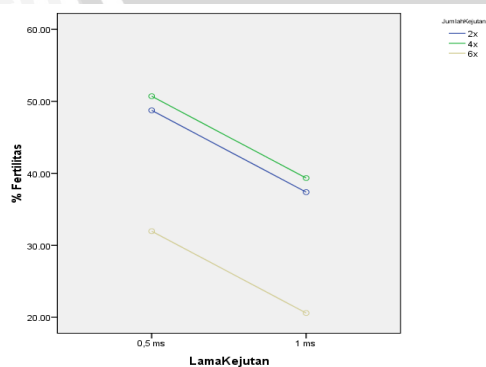
Berdasarkan hasil perhitungan analisis sidik ragam diperoleh bahwa perlakuan jumlah kejutan (*Pulse Number*) tidak memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap viabilitas sperma, karena hasil Sig. (0,154) > α . Sedangkan lama kejutan (*pulse length*) memberikan nilai berbeda sangat nyata dengan nilai Sig. (0,007) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 .

Pemberian lama kejutan (*Pulse length*) mempengaruhi nilai viabilitas sperma. Jadi, semakin banyak jumlah kejutan, maka nilai viabilitas semakin menurun akibat kerusakan membran. Menurut Weaver (1993), menyatakan bahwa kerusakan membran spermatozoa akan berdampak pada membran yang pada awalnya mempunyai sifat permeabel tidak mampu lagi menyeleksi keluar masuknya zat, yang pada saat dilakukan uji warna eosin negrosin zat tersebut bisa

masuk ke dalam plasma. Ditambahkan oleh Yulham (2007), permukaan spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein. Apabila spermatozoa tersebut mati maka permeabilitas membrannya meninggi, terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan sperma yang membedakan spermatozoa yang hidup dengan spermatozoa yang mati.

Fertilitas adalah kemampuan sperma ikan untuk membuahi telur. Menurut Effendie (1997) fertilisasi merupakan proses bergabungnya inti spermatozoa dengan inti telur sitoplasma sehingga membentuk zigot. Fertilitas merupakan persentase keberhasilan proses penyatuan sel gamet jantan dan sel gamet betina untuk membentuk satu sel (zigot).

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah telur yang terfertilisasi oleh sperma, didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 4x sebesar 50,43% , sedangkan yang terendah terjadi pada perlakuan 1 ms dan jumlah kejutan 6x sebesar 18,07%.



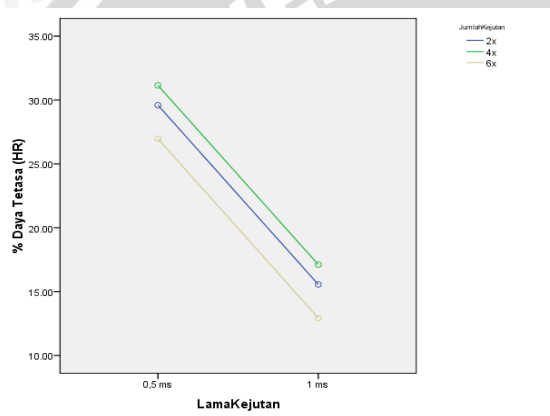
Gambar 3. Grafik Daya Fertilitas

Hasil perhitungan sidik ragam daya fertilitas menunjukkan Sig. perlakuan *pulse length* berbeda nyata terhadap daya fertilitas ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), dengan nilai Sig. (0,022) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sama halnya dengan lama kejutan (*pulse number*) memberikan nilai berbeda nyata terhadap fertilitas ikan nilem (*Osteochilus hasselti*), dengan nilai Sig.(0,010) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 .

Dapat disimpulkan bahwa, suatu proses elektroporasi mempengaruhi kualitas dari sperma saat melakukan proses fertilisasi. Menurut Bakker *et al.* (2006), fertilitas pada ikan tergantung pada jumlah dan kualitas sperma. Perbedaan kemampuan fertilisasi berkaitan dengan beberapa faktor seperti perbedaan motilitas sperma, ukuran sperma, kecepatan dan laju metabolisme.

Tingkat penetasan telur berhubungan erat dengan tingkat pembuahan telur. Sesuai dengan pernyataan Oyen *et al.* (1991) bahwa, daya tetas telur selalu ditentukan oleh tingkat pembuahan, kecuali ada faktor lingkungan yang mempengaruhinya, selanjutnya Masrizal dan Efrizal (1997), melaporkan bahwa derajat penetasan telur akan menurun dengan semakin menurunnya derajat pembuahan telur atau sebaliknya derajat penetasan akan meningkat dengan semakin meningkatnya derajat pembuahan.

Telur yang sudah terfertilisasi dan diamati perkembangannya hingga menetas sekitar 20-30 jam, menunjukkan analisa presentase daya tetas didapatkan data nilai tertinggi terdapat pada perlakuan lama kejutan 0,5 ms dan jumlah kejutan 2x sebesar 30,56%, dan nilai paling rendah terdapat pada lama kejutan 6 ms dan jumlah kejutan 2 x sebesar 12,25 % Persentase daya tetas mengalami penurunan seiring dengan laju pertumbuhan telur yang sudah dibuahi.



Gambar 4. Daya Tetas Telur Ikan Nilem

Hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan untuk perlakuan (lama kejutan) *Pulse Length* berbeda nyata, dengan nilai Sig. (0,010) < α yang berarti menerima H_1 menolak H_0 . Sedangkan untuk perhitungan *Pulse Number* (lama kejutan) tidak berbeda nyata, dengan nilai Sig (0,723) < α , yang berarti menerima H_1 menolak H_0 .

Hubungan antara Lama kejutan dan daya tetas menunjukkan adanya penurunan persentase seiring dengan meningkatnya lama kejutan (*pulse length*). Jadi semakin tinggi lama kejutan, maka semakin rendah daya tetasnya (*Hatching*

rate). Menurut Yustina (2003) keberhasilan pembuahan sangat tergantung pada kualitas dan kuantitas sperma. Daya tetas meningkat ketika tekanan osmotik berbeda diterapkan pada sel sperma, yang menunjukkan bahwa elektroporasi tidak berpengaruh pada HR. Survival rate lebih rendah ketika voltase kejutan dinaikkan. Menurut Tsai (2000), daya tetas embrio yang berasal dari fertilisasi hasil perlakuan elektroporasi sperma, menunjukkan penurunan secara drastis seiring penambahan voltase. Dia juga menambahkan bahwa hanya sedikit perbedaan daya tetas telur antara yang dibuahi dengan sperma elektroporasi dan sperma kontrol hanya selisih 4% lebih besar pada sperma kontrol. Selain itu, Kekurangan oksigen merupakan salah satu penyebab adanya kematian pada telur atau embrio yang sedang berkembang (Woynarovich dan Horvath, 1980).

Pengamatan intensitas GFP menentukan berapa besar nilai pendaran yang terjadi pada sperma di setiap perlakuan.

Hasil analisa intensitas pendaran GFP pada sperma yang mencapai inti didapatkan hasil terbaik pada perlakuan 0,5 ms 6x, persentase integrasi GFP mencapai 53,25 % dengan intensitas sebesar 1900 *Arbitrary*. Sedangkan hasil yang terendah terjadi pada perlakuan 0,5 ms 2x persentase integrasi GFP sebesar 11,11 % dengan intensitas sebesar 650 *Arbitrary*.

Semakin banyak jumlah kejutan, maka integrasi GFP ke inti semakin besar. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan sin (1998), bahwa lama kejutan dan jumlah kejutan yang tinggi lebih efektif untuk transfer gen dengan DNA konsentrasi rendah. 'Teissie' dan Ramos (1998) mengatakan, fusi sel tergantung pada jumlah kejutan. Pada kejutan lebih dari dua, fusi dari sel memiliki nilai yang tinggi yaitu 80% dan dari hasil pengamatan memiliki pengaruh yang maksimal terhadap kenaikan jumlah kejutan.

Intensitas GFP dalam embrio mengalami perubahan seiring pertumbuhan oosit menjadi larva yang siap menetas. Pada embrio kontrol masih menunjukkan adanya ekspresi GFP sebesar 800 *Arbitrary*, hal ini masih menunjukkan adanya Autofluorescence. *Autofluorescent* adalah pendaran alami, sebagian besar terdiri dari flavins dan porphyrins. Pada hasil penelitian Prausnitz *et al.* (1993) pada perlakuan kontrol menunjukkan bayangan dengan pendaran lemah, hal tersebut disebabkan oleh kombinasi *autofluorescent*, latar belakang dari ikatan permukaan *fluorescence*. Hasil pendaran tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x, dengan intensitas sebesar 3950 *Arbitrary*, sedangkan pendaran terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 4x dengan intensitas sebesar 1200 *Arbitrary*.

Pengamatan ekspresi gen GFP dilakukan untuk mengetahui intensitas

pendaran GFP setelah telur menetas. Pada umumnya efektifitas GFP yang sudah terintegrasi di sperma mengalami pengurangan seiring pertumbuhan sel telur yang terfertilisasi hingga telur menetas.

Pada larva kontrol masih menunjukkan adanya sedikit pendaran GFP, hal itu disebabkan adanya sedikit *autofluorescence*. Sehingga bisa dipastikan pada larva perlakuan terjadi pendaran GFP. Intensitas pendaran GFP pada sperma kontrol pada bagian kepala dan badan sebesar 2900 *Arbitrary*, sedangkan pada bagian ekor mencapai 1800 *Arbitrary*. Pada larva perlakuan, intensitas pendaran tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5ms 6x pada kepala dan perut sebesar 3300 *Arbitrary*, sedangkan ekor sebesar 2300 *Arbitrary*. Pendaran terendah terjadi pada perlakuan 1 ms 2x dengan intensitas pada kepala dan perut sebesar 2500 *arbitrary* sedangkan pada ekor sebesar 2300 *arbitrary*.

Kualitas air mempengaruhi pertumbuhan dan kelangsungan hidup biota air yang dipelihara, oleh karena itu, kualitas air harus berada pada kondisi optimum. Dengan demikian perubahan kualitas air harus selalu dipantau, agar perubahan kualitas air diketahui (Ghufran dan Andi, 2002). Kualitas air media penetasan telur berada dalam kondisi normal dengan nilai dengan suhu 27-30 °C, pH 7,61 sedangkan DO sebesar 4,42 sampai 5,80 mg/l.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, kesimpulan yang didapatkan antara lain :

- Pemberian kejutan 40 volt dengan lama kejutan (*Pulse lenght*) dan jumlah kejutan (*Pulse number*) memberikan pengaruh motilitas dengan nilai tertinggi sebesar 85% pada perlakuan 1 ms 2x, sedangkan, nilai viabilitas terbaik pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 64,99%, sedangkan daya fertilitas nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 50,43%, namun kualitas daya tetas menurun sebesar 30,56% pada perlakuan 0,5 ms 2x.
- Transfer GFP dengan metode elektroporasi menghasilkan pendaran intensitas sperma tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 1900 *arbitrary*, pada embrio nilai tertinggi terjadi pada perlakuan 0,5 ms 4x sebesar 3950 *arbitrary* serta larva nilai tertinggi sebesar 3300 *arbitrary* pada kepala dan perut, sedangkan pada bagian ekor sebesar 2300 dengan perlakuan 0,5 ms 6x.
- Integrasi GFP pada sperma dengan nilai tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 6x sebesar 53,25%
- Kualitas air pada bak inkubator berada pada kisaran normal. Untuk suhu 27-30 °C, pH 7,61 sedangkan DO sebesar 4,42 sampai 5,80 mg/l.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disarankan bahwa pada proses pembuatan ikan transgenik berdasarkan metode elektroporasi sebaiknya menggunakan tegangan 40 volt, lama kejutan 0,5ms dan jumlah kejutan 6x dengan konsentrasi DNA (GFP) 60 ng sebagai gen marker.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, M.U.K., Haetami, P., dan Mulyani, Y. 2007. Penelitian Dasar (LITSAR) UNPAD Penggunaan Limbah Kiambang Jenis *Duckweeds* dan *Azola* dalam Pakan dan Implikasinya pada Ikan Nilem. LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS PADJADJARAN, Bandung. 32 halaman.
- Alimuddin, M.H., Fariduddin Ath-thar, L.I Purwanti, dan Odang Carman. 2009. Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dapat digunakan untuk Membuat Ikan Lele dan Ikan Mas Transgenik.
- Anonymous, 2009a. Nilem (*Osteochilus hasselti*).<http://gandainc.blogspot.com> Diakses pada tanggal 2 Februari 2011.
- _____, 2009b. Bioteknologi.<http://www.tedi.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 2 februari 2011.
- _____. 2009c. Rekayasa Genetika. Diakses dari <http://elearning.unej.ac.id>.
- Bakker, Theo C.M., Marc Zbinden., Joachim G Frommen., Alexander Weiss., dan Carlo R Largiadèr. 2006. Potential effects of sea level rise on the terrestrial habitats of endangered and endemic megafauna in the Northwestern Hawaiian

- Islands. Endangered Species Res.. UK. 2:21-30
- Chalfie, M Tu, Y Euskirchen, G Ward, WW and Prasher, DC .1994. Gene Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. Science 263:802-805.
- Dude, E. J., dan Satya, N. M. 1995. Statistika Matematika Modern. Penerbit ITB. Bandung.
- Effendie.1997. Biologi Perikanan. Yayasan Pustaka Nusantara, Yogyakarta. Halaman 50–71.
- Gagne, M.B., F. Pother, dan M.A. Sirard.1991. Effect of Microinjection in Vitro Matured Bovine Oocytes on In Vitro Development of Embryos. Biol of reproduction. Halaman 44 : 76.
- Handarini, Ristika. 2001. Ternak Transgenik: Prosedur, Bioetika dan Keamanannya. Diakses dari : <http://www.rudyc.com/PPS702-ipb/02201/ristika.htm>
- Hardjamulia, A.1979. Budiadaya Perikanan. Budiadaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L), Ikan Tawes (*Puntius javanicus*), dan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*. SUPM Bogor.Badan Pendidikan, Latihan pertanian dan Penyuluhan Pertanian. Departemen Pertanian. Halaman 1-7.
- 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. Vol. 2 :218-221.
- Heim, R., Prasher, D.C., dan Tsien, R.Y .1994. Wavelength Mutation and Post-Translational Modifcation of Green Fluorescent Protein. Proceedings National Academy of Science USA. 91:12501-12504
- Gufran dan Andi, B. 2002. Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan. Rineka Cipta. Jakarta. 208 halaman.
- Masrizal dan Efrizal. 1997. Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertilisasi Sperma dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). Fisheries Journal Garing 6: 1-9.
- Oyen, F.G.F., L.F.C.M.M. Camps, dan E.S.W. Bongo. 1991. Effect on acid stress on embrionic development of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 19: 1-12
- Rustidja. 2002. Diktat Kuliah Breeding dan Reproduksi Hewan Air. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Halamn 4-16.
- Rols, M.P., dan Justin T. 1998. Electroporabilization of Mammalian Cells to Macromolecules : Control by Pulse Duration. Biophysical Journal Volume 75 september 1998 1415-1423
- Toelihere R. Mozes.1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak, Penerbit Angkasa Bandung.
- Tsai, H.J.2000. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. Molecular Reproduction and Development 56: 281-284.
- Teissie', J., dan C. Ramos. 1998. Correlation Between Electric Field Pulse Induced Long-Lived Permeabilization and Fusogenicity in Cell Membranes. Biophysical Journal April 1998 74: 1889–1898
- Weaver.1993. Electroporation: a General Phenomenon For Manipulating Cells and Tissue. J. Cell. Biochem. 51:426-435
- Woynarovich, E dan L. Horvath .1980. The Artificial Propagation of

Warm Water Fin fish- A manual Of Extension. FAO. Fhiseries Technical Paper. Rome. 201: 1- 183

Yitnosumarto,S.1993. Percobaan Perancangan, Analisis dan Interpretasinya. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Halaman 124-166.

Yustina, A., dan Darmawati. 2003. Daya Tetas dan Laju Pertumbuhan Larva Ikan Hias *Betta splendens* di Habitat Buatan. Jurnal Natur Indonesia 5 (2) : 129-132 (2003) ISSN 1410-9379

Zhu. Z., Li, G., He, L., dan Chen,S.1985. Novel gene transfer into the fertilised eggs of gold fish (Carassius auratus L. 1758). Journal of Applied Ichthyology 1: 31-34.

