BIDANG ILMU KETAHANAN PANGAN

LAPORAN PENELITIAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH II
TAHUN ANGGARAN 2009

1000437

STUDI EKSPRESI GEN HORMON PERTUMBUHAN IKAN TILAPIA (*Oreochromis Niloticus*) PADA IKAN LELE (*Clarias spp*) DALAM PEMBUATAN IKAN TRANSGENIK

Tim Peneliti :
Ir. Aming Wilujeng Ekawati, MS
Ir.Abdul Rahem Faqih, Msi
Feni Iranawati, SPi, MS

Dibiayai Oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Sesuai Prioritas Nasional Batch II,
Nomor : 315/SP2H/PP/DP2M/V/2009, tanggal 16 Juni 2009

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOPEMBER 2009

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI
PRIORITAS NASIONAL BATCH **II**

1. **Judul** Penelitian :
   Studi Ekspresi Gen Hormon Pertumbuhan Ikan Tilapia (***Oreochromis Niloticus)*** Pada Ikan Lele (***Clarias Spp***)**Dalam** Pembuatan Ikan Transgenik

2. Ketua Peneliti

   a Nama Lengkap dan Gelar : Ir.Arning Wilujeng Ekawati, MS
   b Jenis Kelamin : Perempuan
   c NIP. 19620805 19860322001
   d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
   e Jabatan Struktural : -
   f. Bidang Keahlian : Budidaya Perikanan
   g. Fakultas/Jurusan : Perikanan dan Kelautan
   h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya, Malang
   i. Tim Peneliti

NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
Ir.Abdul Rahem faqih, MSi	Reproduksi Ikan/genetika	Perikanan dan Kelautan	Universitas Brawijaya
Feni Iranawati, SPi, MSi	*Biologi Reproduksi* Molekuler	Perikanan dan Kelautan	Universitas Brawijaya

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

   a. Jangka Waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
   b. Biaya Total yang diusulkan : Rp. 192.500.000
   c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 87.000.000,-

Malang, 30 November 2009
Ketua Peneliti

Ir.Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP 19620805 198603 2 001

Fakultas Perikanan dan Kelautan
Dekan

Prof.Dr.Ir.Eddy Suprayitno,MS
NIP.19591005 198503 1 004

Menyetujui,
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaemi, MS
NIP. 19530514 198002 2 001

repository.ub.ac.id

PRAKATA

Dengan memanjat puji syukur kehadlrat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hldayah-Nya penulls dapat menyelsaikan laporan penelltian yang berjudul : Studi Ekspresl Gen Hormon Pertumbuhan ikan Tilapia (*Oreochromis Niloticus)* Pada lkan Lele *(Clarias Spp)* Dalam Pembuatan Ikan Tranegenik

Tullsan lnl menyajlkan pokok-pokok bahasan yang meliputi hal-hal yang telah dihasilkan pada tahun pertama yaltu ; proses optlmasl tegangan gene pulser sebagal sarana trasfer gen, metode untuk melakukan trasfer gene dengan metode elektroporasi dengan sperms sebagai vektornya. Selain itu dalam tulisan ini juga menampilkan hasil analisa ekspresi gen GFP /DNA pada embrio, larva serta lnteraksi GFP dengan sperma ikan lele.

Untuk semua itu dengan segala kerendahan hati penulls lngin menyampalkan terima kasih yang tidak terhingga kepada :

- Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendldlkan Naslonal Jakarta yang telah mendukung dalarn pendanaan

  Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat Universitas Brawljaya Maiang

  Semua pihak yang telah mendukung membantu penelltian ini sehingga penelitian ini dapat disajikan danlam bentuk iaporan.

Penulis menyadari bahwa laporan ini tidak lepas dari adanya keterbatasan dan kekurangan meskipun telah berusaha sekuat tenaga untuk penyempurnaan tulisan ini. Oleh karena itu kritik membangun dan saran sangat kaml harapkan sehingga karya ini dapat *memberikan manfaat* kepada semua plhak yang membutuhkan.

Malang, 30 November 2009

nu

Penulis

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

Ir. ABDUL RAHEM **FAQIH,** MSI. : **Studi ekspresi** Gen **Hormon Pertumbuhan** Ikan **Tilapia (*Orechromis Niloticus*)** Pada Ikan Lele *(Clarias* Spp.) Dalam **Pembuatan Ikan Transgenik.**

Tujuan **penelitian** pada tahun pertama *ini untuk* mengetahui 1) Optimasi tegangan dalam transfer gen (GFP), 2) Interaksi gen GFP dengan sperma ikan **lele,** 3) Ekspresi gen GFP dalam **embrio dan** larva sebagai gene reporter, 4) efektifitas promoter ***(mβP)*** ikan medaka dalam sperma ikan lele Penelitian ini **dilaksanakan** di Laboraturium **Biologi** dan **Reproduksi** Ikan (Laboraturium Breeding) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboraturium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) **Universitas Brawijaya** Malang, **Jawa** Timur, Laboratorium Genetika **Fak.perikanan dan** Ilmu Kelautan *IPB.*

Metode yang digunakan dalam penelltian ini adalah **metode** eksperimen . *Untuk mencapai tujuan* penelitian ini, maka akan dilakukan tahapan-tahapan penelitian sebagal **berlkut :Tahap I :** 1) Perbanyakan konstruksi gen konstruksi gen *mBP* **−** GFP, *mBP– TIGH (IPB,Bogor),* 2) Aklimatisasi dan pemeliharaan induk jantan dan **betina** lkan Lele (**Clarias** sp., 3) Pengambilan **Sperma dan** Telur ikan Lele, 4) Analisa **Kualitas Sperma** (**motilitas, viabiltas, fertilitas)**: Tahap **I ;** 1) *Optimalisasi Tegangan* (V) Terhadap sperma *(motilitas, viabilitas, Fertilitas),* 2) *Optimaslisasi* konsentrasi DNA konstruksi, 3) Analisa Interaksi sperma- **mBP − GFP,4)** *Analisa* ekspresi GFP dalam **embrio** dan **larva** lkan lele dengan menggunakan mikroskop konvokal.

Hasil pengamatan pada sperma **sebelum** dilakukan **kejutan** menggunakan tegangan **listrik** yang berbeda, **diketahui** jumlah sel sperma adaiah **±5,6x10^9 sel/ml (±5,6x10^6 sel/µl)** dengan **tingkat** motilitas sebesar **60%** dan tingkat **viabilitas** sebesar 85%. **Hasil penelitian** menunjukkan bahwa **pemberian kejutan listrik** dengan **tingkat voltase** yang **berbeda** berpengaruh nyata terhadap **motilitas** sperma namun tidak berpengaruh nyata terhadap daya **fertilisasi** dan **viabilitas** sperma serta daya tetas telur **Hasil** uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan A (40 **V/cm)** memberikan hasil motilitas **terbaik** sebesar **40%, diikuti** oleh perlakuan B (160 **V/cm), C** (280 Vlcm), D (400 **V/cm),** E (520 Vlcm) masing-masing sebesar **30%, 28,33%, 23,33%,** 18.33%. Berdasarkan **analisis** polynomial orthogonal, hubungan antara perlakuan tegangan dengan hasil motilitas sperma ***berbentuk*** linier dengan **persamaan** yanu 39.198 + **(-0,04)x** dengan R^2 = 0,933 dan r = 0,966. Semakin *tinggi* tegangan yang diberikan maka semakin **rendah** motilitas sperma yang dihasilkan. Dengan **kondisi** tegangan 40 v dan konsentrasl GFP 90 **ng/ul** telah memperlihatkan bahwa sperma sebagai vektor transfer gen telah memperlihatkan hasil positip, **dimana** telur yang **dibuahi** dengan sperma hasil elektroporasi **tersebut** telah menghasilkan **embrio** dan larva yang **mengekspresikan** GFP *pada hampir jaringan* tubuhnya. Sedangkan *intereaksi* **GFP dengan** sperma **sebagian besar posisinya** pada **posterior kepala** sperma.

Pengamatan kualitas air **selama penelitian** yang **meliputi suhu,** pH **dan** DO **masih dalam batas** klsaran yang **dapat** menunjang proses **penetasan** telur, dengan **nilai rata-rata** suhu **berkisar** antara 24-25' C, pH berkisar antara 7-8,5 dan DO berkisar antara **1,25-3,5 mg/l.**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

EXCUTIVE SUMMARY

ABDUL RAHEM FAQIH : 'Study on Gene expression of Tiiapia in Making *Trangenic Clarias spp*".

The research aims to know ; 1) optimation of voltage to transfer GFP, 2) GFP-Sperm Interaction. 3) Expression of **GFP** in embrio and Larvae as gene transfer, 4) effective of promoter. The research was conducted at LSIH Universitas Brawijaya, Breeding and Genetic Laboratory of Fisheries Faculty and Marine Science Brawijaya University, Reproduction and Genetics Laboratory, Fisheries Faculty and Marine Science, Agricultural of Bogor University.

The method is exprlmental, and work steps were : Step I : 1) Cloning of gene Construction, 2) take ovary and catfish sperm, 3) aclimatation and rearing of cathfish broostock, analysis sperm quality, step II : optimation of voltage to sperm, 2) optimation of DNA concentration, 3) Analysis of interaction sperm-GFP, 4) analysis of GFP expression in embrio and larvae, based on convocal microscope.

The used sperm dencity was 5,6 x 10⁸ cell/ml, and motility procentase is 60%, and viability level is 85 %. The result was that voltage influentials significanntly to motility, but not to viability. The 40 v gives the best motility level, 40%. The correspondenship of voltage and motility was clearly difined as equation below : Y = 39, 198-0,04x, R2 = 0,933, r = 0.966. the higher voltage can down sperm motility. The combination of 40 v and 90 ng/ul resulted that sperm as gene transfer vector, where sperm was still ability to fertilize ovum, which was GFP was expressed almost at all body of embrio and larvae, Interaction of GFP and sperm was in head posterior of sperm.

The media quality was still support to embrio and larvae life, temperature : 24-25o C; pH 7- 8,5 ; DO 1,25 – 3,

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

ISI	Halaman
PRAKATA	i
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	
BAB II STUDI PUSTAKA	
2.1 Ikan Lele (Clarias gariepinus)	3
2.2 Ikan Tilapia (Oreochromis niloticus)	3
2.3 Gen Hormon Pertumbuhan dan GFP	4
2.4 Perkembangan Teknologi Transgenik Ikan	7
2.5 Teknologi Elektroporasi	10
2.6 Konstruksi Gen-Promoter	10
2.7 Ekspresi Gen GFP	11
2.8 GFP sebagai marker biologi	12
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1 Tujuan Khusus	16
3.2 Manfaat Penelitian	17
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Skematik Permasalahan dan Solusi	18
4.2 Diagram Alir Penelitian	18
4.3 Tahapan Penelitian	19
4.4 Perbanyakan Konstruksi	20
4.5 Seleksi Induk, Pemijahan	20
4.6 Anallsa Kualitas sperma	21
4.7 Anallsa Ekspresi gen GFP embrio dan Larva	21
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. OPTIMASI TEGANGAN ELEKTROPORASI	23
5.1 Kualitas sperma ikan Lele	23
5.1.1 Motilitas Sperma control	24
5.1.2 Viabilitas	25
5.2 Kualitas sperma Pasca elektropor	26
5.2.1 Motilitas Sperma	27
5.2.2 Viabilitas sperma	30
5.3 Daya Fertilisasi	32
5.4 Daya tetas	35
5.5 Hubungan antar parameter	37
5.5.1 Motilitas dengan viabilitas	38
5.5.2 Motilitas dengan Daya tetas	38

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

5.5.3 viabilitas dengan Daya Tetas 39
5.5.4 Daya Fertlllsasl dengan Daya Tetas 40

B.OPTIMASI KONSENTRASI GFP

5.6Hasil Pengamatan Sperma control 41
5.6 .1 Kualitas Sperma Perlakuan 42
5.6.2 Interaksi GFP pada sperma 46
5.6.3 Ekspresl GFP pada Embrlo 49
5.6.4 Ekspresl GFP pada larva ..... .51
5.6.5 Derajat Fertilisasi 52
5.6.6 Derajat Penetasan telur 53
5.7 Pembahasan 54
5.6.1 Kualltas sperma control 54
5.6.2 Kualltas sperma Perlakuan 57
5.6.3 Interaksi FGP pada sperma 59
5.6.4 Ekspresl GFP pada Embrio 61
5.6.5 Ekspresl GFP pada larva 62
5.6.6.Derajat fertilisasi 62
5.6.7 Derajat Penetasan 63
5.6.8 Kualltas Alr Media 65

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6. 1 Kesimpulan 67
6. 2 Saran 68

DAFTAR PUSTAKA 69

LAMPIRAN 79

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Perbanyakan konstruksi gen	79
2. Prosedur Pengukuran konsentrasI DNA dan RNA	82
3. Panduan operasional Elektroporarator	83
4. Gambar Sperma Lefe	85
5. Berat Induk dan Gonad	88
8. Gambar Gonad Ikan Lele jantan	87
7. Gene Pulser	88
8. Perkembangan embrio	89

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1 : Grafik motilitas sperma	27
Gambar 2 : Grafik Pengaruh tegangan terhadap motilitas	28
Gambar 3 : Grafik Lama motilitasn	29
Gambar 4 : Grafik Pengaruh Tegangan terhadap viabilitas	32
Gambar 5 : Grafik Pengaruh Pemberian Tegangan terhadap.....	33
Gambar 6: Gamber Sperma setelah diberi teganga	34
Gambar 7: Grafik daya tetas	36
Gambar 8: Grafik perbandingan antar parameter	37
Gambar 9:Grafik motilitas sperma	43
Gambar 10 : Grafik viabilitas	45
Gamber 11 : Grafik hubungan motilitas dan viabilitas	46
Gambar 12 : Posisi interaksi GFP pada sperma	46
Gambar 13 : Perbendingan interaksi GFP –sperma	49
Gamber 14 : Ekspresi GFP pada Embrio	50
Gambar 15 : Ekpresi GFP pada Larva	51
Gambar 16 : Grafik daya Fertilisasi	53

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kebutuhan mansuia akan ikan lele setiap waktu semakin meningkat seiring kesadaran manusia untuk mengkonsumsi bahan panggan bergizi, harga terjangkau seluruh lapisan masyarakat. Produktivitas ikan Lele belum mampu mengimbangi permintaan pasar domestik yang makin meningkat. Hal tersebut tidak lepas dari adanya kendala tingkat pertumbuhan induk yang relatif lambat. Kelangkaan induk bermutu dengan tingkat pertumbuhan cepat belum terpenuhi, padahal kebutuhan benih bermutu semakin meningkat..

Kecepatan pertumbuhan ikan lele sangat dipengaruhi oleh aktifitas gen hormon pertumbuhan yang mengendalikan laju pertumbuhan. Untuk meningkatkan laju pertumbuhan ikan Lele tersebut dapat dilakukan dengan teknologi transgenik dengan metode elektroporasi telur dan sperma.. Karena menurut Kang et *al* (1990) sel sperma dapat digunakan sebagai media untuk transfer gen (DNA) ke dalam telur. Selanjutnya dikatakan bahwa prosedur teknik elektroporasi ini lebih mudah dibandingkan mikroinjeksi. Dan menurut Tsai et *al*. (1995) laju penggabungan DNA dalam transfer gen dengan teknik elektroporasi ini bisa mencapai 50%. Untuk itu dirasa perlu dilakukan penelitian transfer gen hormon pertumbuhan pada ikan lele dengan spenna sebagai media untuk memasukkan gen hormon pertumbuhan dengan menggunakan metode elektroporasi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Salah satu penelitian DNA rekombinan yang potensial untuk dikembangkan di Indonesia adalah penggunaan hormon pertumbuhan (Growth *hormone*) untuk meningkatkan laju pertumbuhan ikan. Dan diantara yang perlu menjadi pertimbangan *penting dalam aplikasi teknologi ini* adalah konstruksi gen, termasuk di dalamnya promoter dan metode yang digunakan untuk transfer gen tersebut. Untuk itu perlu dilakukan penelitian transfer gen hormon pertumbuhan pada ikan lele dengan sperma sebagai media *(vektor) untuk memasukkan* gen *hormon pertumbuhan* dengan menggunakan metode elektroporasi. Karena pada sisi lain penelitian transgenik pada ikan lele *(Clarias spp.)* dengan menggunakan metode elektroporasi terhadap sperma ikan sebagai media transfer gen *masih* belum *dilakukan di* Indonesia dan relatif mudah dibandingkan metode lainnya.

Namun demikian untuk melakukan proses transfer gen pertumbuhan, terlebih dahulu perlu *dilakukan suatu tahapan penelitian* yang mampu mendeteksi *tingkat* keberhasilan dari suatu transfer gen dengan menggunakan gene reporter (gen marker). Salah satu gen marker yang biasa digunakan dalam kajian transgenesis adalah gen GFP yaitu gen yang mengkodekan protein *yang berpendar hijau dan* dapat *divisualisasikan* menggunakan mikroskop flourescent (Chou el at., 2001; Ath-Thar, 2007) atau sebagai gen target seperti dalam pembuatan ikan hias berpendar yang berwarna-warna (Gong et al., 2002). Keberadaan *gen* mi di dalam sel tidak *akan membahayakan sel*, keuntungan *dari* gen *ini* adalah tidak memerlukan perlakuan khusus pada jaringan dan penambahan subtrat untuk visualisasi, dan ekspresinya dapat terdeteksi sampai ke tingkat sel dengan menggunakan sinar W (Chalfei *dalam* Lyengar *et al*, 1996).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB II

STUDI PUSTAKA

21 Ikan Lele (*Clarias spp*)

Ikan lele merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang ditargetkan oleh pemerintah sebagai ikan konsumsi masyarakat. Jenis ikan lele yang banyak terdapat pada masyarakat saat ini ini adalah ikan lele dumbo *(Clarias* sp.). Rustidja (1999) mengatakan ikan lele dumbo merupakan ikan hibrida antara ikan lele yang berasal dari Taiwan *(Clarias Fuscus*) dengan ikan lele Afrika (*Clarias gareipinus*). Hasil persilangan *mi* kemudian diintroduksi ke Indonesia sekitar tahun 1986. Karena pertumbuhan tubuhnya yang lebih cepat dibandingkan dengan ikan lele Lokal *(Clarias bathracus*). Ikan lele tersebut termasuk ke dalam famili Claridae dengan ciri-ciri khas mempunyai alat pernafasan tambahan yang terletak di bagian depan rongga insang yang memungkinkan ikan lele mengambil oksigen langsung dari udara.

2.2 Ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Ikan Tilapia disebut juga nila merupakan jenis ikan air tawar yang bernilai ekonomis tinggi. Jenis ikan ini banyak dibudidayakan oleh masyarakat baik di kolam maupun jaring apung karena mempunyai propspek pasar yang sangat baik. Pada genus Oreochromis, induk ikan betina mengerami telur dan larvanya dalam rongga mulut, menjaga dan membesarkan larvanya sendiri. Pemijahan ikan nila terjadi pada setiap musim hujan dan biasanya dalam satu tahun dapat memijah sebanyak 6 – 7 kali. Ikan nila akan mencapai dewasa pada umur 4- 6 bulan dan masa pemijahan produktif induk adalah 1,5 – 2,0 tahun dengan bobot diatas 500 g/ekor.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

23 Gen Hormon Pertumbuhan dan GFP

Gen dapat diartikan sebagai bagian dari genom yang berperan dalam proses ekspresi gen. Peranan tersebut sebagagi ruas model atau ruas penyandi dalam proses transkripsi. Dari keseluruhan genom organisme tidak seluruhnya menjadi ruas penyandi, hanya bagian yang diapit oleh promotor dan terminator. Promotor adalah segmen DNA yang mempunyai panjang sekitar 40 pb dan berfungsi sebagai tempat enzim polimerasi RNA bekerja memulai transkripsi, dan terminator merupakan segmen DNA tempat berakhirnya proses transkripsi atau enzim polimerasi berhenti bekerja. Jadi gen merupakan ruas-ruas DNA dalam sintesis RNA yaitu daerah yang diapit oleh promotor (titik awal) dan terminator *(titik akhir) transkripsi (Yusuf, 2001).*

Gen pengkode hormon pertumbuhan adalah rangkaian basa yang dipemleh dari hasil eksraksi DNA sampel/jaringan. Untuk memperoleh pengkode hormon pertumbuhan dapat dilakukan dengan mengambil cDNA kelenjar pituitary ikan. Kelenjar pituitary merupakan *tempat terdapatnya gen pengkode hormon pertumbuhan*. Gen pengkode hormon pertumbuhan untuk ikan lele dumbo belum terdapat pada bank gen. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan gen pengkode hormon pertumbuhan yang berasal dari ikan nila. Menurut Kobayashi (2006) gen pengkode hormon pertumbuhan ikan nila ((*ti*GH) mempunyai ukuran 380 bp yang diamplifikasi dengan menggunakan RT-PCR dan menggunakan cDNA yang diperoleh dari kelenjar *pituitary* ikan nila (berdasarkan *gene Bank accession Number OA7830*). Namun dari data yang diperoleh untuk gen pengkode hormon pertumbuhan pada ikan nila adalah *Acession Number M26916* dimana mempunyai ukuran 847 bp. Dari data Bank Gene tersebut gen pengkode hormon

pertumbuhan iken nila terdapat pada basa ke 87 sampai 647 atau peptida ke 36 sampai 86).

Pertumbuhan merupakan proses biologi yang kompleks, dapat terjadi apabila ada kelebihan energi dan materi yang berasal dari pakan yang dikonsumsi. Pertumbuhan terjadi pada beberapa tingkat materi biologi seperti sel, jaringan, organ, organisme, populasi dan komunitas. Dan pertumbuhan itu sendiri dipengaruhi oleh faktor genetik, hormon dan lingkungan (Fujaya, 2004). Pertumbuhan jaringan atau organ selain dipengaruhi makanan juga dipengaruhi hormon pertumbuhan, baik faktor perangsang pertumbuhan maupun hormon penghambat pertumbuhan. Kedua hormon ini memiliki peran yang saling bertentangan. Faktor perangsang pertumbuhan berperan mengaktifkan pembelahan sel, sebaliknya faktor penghambat pertumbuhan menghambat pembelahan sel (Res dan Stenberg, 1984).

Tubuh ikan mengubah protein dalam makanan menjadi protein yang sesuai dengan kebutuhannya. Secara kimiawi ada dua proses dasar yang harus diselesaikan untuk *sintsis* protein, yakni *sintesis* asam amino dan konjugasi asam amino yang sesuai untuk membentuk masing-masing jenis protein pada setiap sel. Proses ini merupakan pertumbuhan yang paling mendasar, sebab tanpa adanya produksi protein secara besar-besaran, maka pertumbuhan tidak mungkin terjadi. (Fujaya, 2004). Selanjumya dikatakan bahwa ada dua cara untuk meningkatkan ukuran suatu organ, yaitu secara hipertropi dalam hal ini jumlah sel tetap, volume bertambah, dan secara hiperflasi dimana jumlah sel bertambah sedangkan volume tetap (Karim, 2002).

Hormon pertumbuhan atau ***Growth Hormone*** (GH) pada ikan diproduksi pada bagian ***anterior pituitary*** yang berfungsi merangsang pertumbuhan dan mengontrol

proses osmoregulasi. Hormon sebagai mediator biokimia dilepas dari tempat produksinya menuju organ target melalui beberapa *cara;* yaitu (a) difusi sederhana di dalam sel atau dari sel satu ke sel lainnya di dalam organ, (b) transportasi melalui darah atau berbagai cairan tubuh sehingga langsung mencapai organ atau sel, atau, (c) secara tidak langsung melalui lingkungan luarnya (Agrara, 1976). *Growth Hormone* (GH) atau somatotropin merupakan hormon polipeptida yang dilepaskan dari adenohipofisa yang menginduksi hati agar mensintesis somatomedin yang berperan langsung dalam pertumbuhan, baik pertumbuhan tulang, otot maupun sel-sel lain. Hormon ini menunda katabolisme asam-asam amino dan memacu inkorporasinya ke dalam protein-protein tubuh. Kerja hormon ini dipermudah oleh pankreas, korteks adrenal dan tiroid yang berkerja bersama-sama dalam memacu metabolisme lemak dan karbohidrat (Calduch-Giner et *al.*, 2000: Walsh 2002). Hormon pertumbuhan mempunyai peranan yang penting pada proses transfer asam amino *ekstraseluller melintasi membran* sel, *khususnya* ke dalam sel-sel otot dan menahan asam amino tersebut tetap didalam sel. Selain itu hormon ini dapat memacu retensi tubuh berbagai mineral dan elemen esensial lain untuk pertumbuhan normal (Walsh, 2002). Hormon somatotropin mempunyai peran penting dalam adaptasi terhadap air laut, reproduksi, dan sistem imun serta pada proses transfer asam amino ekseluler *melintasi membran sel, khsusunya* ke dalam sel otot *dan menahan asam* amino *tetap di* dalam sel (Calduch-Giner et al, 2000). Menurut Matty (1985) GH mampu meningkatkan nafsu makan, konversi pakan, sintesis protein, menurunkan kehilangan nitrogen, merangsang metabolisme dan oksidasi lemak, serta memacu sintesis dan pelepasan insulin. Selain itu, GH juga mempengaruhi osmoregulasi (Sakamoto et *al.*, 1993, Tatsuya

& Hirano, 1993 dalam Li et *al.*, 2005) dan reproduksi (Le Gac et *al.*, 1993; Van Der Kraak et *al.*, 1990 dalam Li et *al.*, 2005)

Untuk menguji aktivitas promoter dibutuhkan gen penanda (reporter) agar ekspresi transgen dapat dilihat dengan lebih cepat sehingga aktivitas promoter segera diektahui. Salah satu gen marker yang biasa digunakan dalam kajian transgenesis adalah gen Green Flourescent Protein (GFP) yaitu gen yang mengkodekan protein yang berpendar hijau dan dapat divisualisasikan menggunakan mikroskop flourescent (Chou el at,, 2001; Ath-Thar, 2007) atau sebagai gen target seperti dalam pembuatan ikan hias berpendar yang berwarna-warna (Gong et al., 2002).

2.4 Perkembangan Teknologi Transgenik Ikan

Dalam ikan budidaya teknologi transgenik ini sudah banyak kemajuan dan kegunaan yang dicapai antara lain, peningkatkan laju pertumbuhan ikan (Devlin et *al* 1995), meningkatkan daya tahan terhadap penyakit (Dunham, 2004), mengurangi laju konsumsi oksigen pada ikan (Cook et *al.*, 2000), studi mengenai fungsi dan pola ekspresi gen serta untuk memproduksi komersial yang diinginkan (Kinoshita & Ozato, 1995). Ikan transgenik dapat pula digunakan sebagai sebagai bioreaktor untuk memproduksi bahan - bahan yang bersifat komersial maupun yang bermanfaat untuk kesehatan manusia (Fletcher & Davies, 1991 & Collas et *al.*, 2000). Sebagai contoh transgenesis yang telah berhasil diantaranya adalah peningkatan laju peratumbuhan dengan mengintroduksi gen GH.seperti pada ikan Salmon Pasifik transgenik yang tumbuh 10 kali lebih cepat dari ikan normal (Devlin *et al*, 1994), begitu pula pada ikan mud loach dengan kecepatan tumbuh 32 kali lebih cepat (Nam, *et al*, 2001), dan ikan nila dengan kecepatan

pertumbuhan 2 kali hingga 7 kali lebih cepat (Kobayasi, et *al, 2007).* Dalam hal transfer gen GH (*opAFP-GHc, opAFP-GHf*) pada ikan *Atlantik* salmon, Du *et al,*(1992b) memaparkan, kecepatan pertumbuhan 5 kali, berat tubuh 4 – 6 kali serta jumlah rata-rata serum GH ikan transgenik lebih tinggi bila dibandingkan dengan ikan non transgenik.

Dalam teknologi transgenesis, daya tahan ikan terhadap suhu dingin berhasil ditingkatkan, bahkan telah berhasil pula membuat ikan strain baru. Introduksi gen Antifreeze *Protein* (AFP) pada ikan koki dapat meningkatkan toleransi terhadap suhu dingin *(O^aC),* dimana pemaparan pada suhu tersebut biasanya menyebabkan kematian ikan (Wang et *al. dalam* Alimuddin et *al.,* 2003). Sedangkan ikan hias strain baru yang dilaporkan oleh Gong *et al. (2002)* adalah ikan zebra berwarna-warni yang dapat terlihat pada kondisi cayaha biasa. Ikan zebra berwarna-warni tersebut dibuat dengan mengintroduksi gen GFP (Green *Flourescent* Protein), YFP (Yellow *Flourescent* Protein), dan RFP (*Red Flourescent* Protein) pada ikan zebra *wild–type* normal.

Telur dan Sperma sebagai media transfer gen [vektor) sangat potensi dikembangkan dalam transgenik ikan karena prosedurnya yang relatif alami dan lebih efisein (Sin *et al.* 1995; Sarmasik, *2002).* Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan mas, lele, dan nila (Muller et *al.,* 1992), salmon (Sin et al., 1993; Symonds *et* dl, 1994a, dan ikan Loach (Tseng et *al,* 1994) dengan tingkat efisiensi berkisar 3 – 90%. Dan untuk mempermudah masuknya konstruksi gen ke dalam sperma perlu dilakukan upaya penggunaan elektroporator. Dan Sperma dapat menjadi vektor yang efisien dalam transfer gen Efektifitas transfer gene dengan elektroporasi sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi (Anderson dan Evans, 1988). Sebagaiaman dikatakan oleh Symond *et al.*(1994b) bahwa pengambilan DNA yang akan

ditransfer oleh sperma salmon tergantung pada tegangan listrik (kV/cm atau V/cm), jumlah kejutan yang dikenakan, konsentrasi DNA. Sedangkan efisiensi transfer DNA ke embrio (telur) dan sperma yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan, lama kejutan (Sin *et al*, 1993; Symonds *et al*, 1994b).

Sarmasik (2002) mengatakan bahwa Sperma berkemampuan mengikat DNA yang selanjutnya dapat digunakan untuk membuahi telur. Untuk meningkatkan efisiensi masuknya konstruksi gen tertentu dalam telur ikan Kang *et al* (1998) juga telah melakukan transfer gen dengan menggunakan sperms sebagai media pengikat konstrukksi gennya (pRSV-CAT) dengan metode elektroporasi (3.5 kV/cm atau 3500 V/cm, 500 u s) dengan hasil tingkat keberhasilan transfer gen sekitar 66%.Sedangkan Lu *et at* (2002) juga menggunakan metode elektroporasi dengan tegangan 600 V/cm – 2000 V/cm,kejutan 20 – 40 μ s, dan konsentrasi fragmen transgen 25 ug/ml dengan tingkat keberhasilan ikan kakap (*Sparus sarba*) membawa *rtGH* sekitar 45%.Cheng *et al.* (2002) melakukan transger gen (pAE6-rtGH1 DNA dengan konsentrasi 100 ug/ml) dengan elektroforasi (9 V/cm, jumlah kejutan 26 kali, 160 μ s) dengan tingkat keberhasilan transfer gen 55%. Menurut Sin et at. (1995) bahwa kondisi elektaroporasi yang optimal untuk trasnfer gen pada abalone (*Haliotis tris*) adalah pada 1000 V/cm, dengan jumlah dan lama kejutan masing-masing 2 kali dan 18.6 atau 27.4 μ s , dengan konsentrasi 100 ug/ml. Sampai saat ini penelitian tentang transfer gen dengan metode elektroporasi telur dan sperma pada ikan lele (*Clarias spp.*) masih belum ada.

2.5 Teknologi Elektroporasi

Dalam pelaksanaan teknologi tranfer gen, ada beberapa metode yang dapat digunakan antara lain ; mikroinjeksi, elektroporasi dan lipofeksi (Hackett, 1993). Metode elektroporasi ini memungkinkan untuk memproduksi ikan transgenik secara masal (Kang et *al*., 1998, Power *et al. dalam* Cheng et *al* 2002). Metode elektroporasi menggunakan serangkain listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel guna membantu transgen / *DNA* rekombinan masuk dalam sel tertentu. Pada umumnya metode elektroporasi digunakan untuk trasnfer gen pada bakteri Yeast, tanaman dan sel-sel hewan (Chent 1995). Elektroporasi memfasilitasi terbentuknya pori-pori temporal pada permukaan membran sel target (Sarmasik 2002).

2.6 Konstruksi Gen dan Promoter

Saat ini teknologi transgenik memungkinkan untuk transfer *DNA* eksogenous ke embrio ikan maupun hewan lainnya dengan dua tujuan utama yaitu untuk studi tentang fungsi pengaturan gen selama perkembangan dan manipulasi genetika serta untuk memproduksi galur transgenik yang mempunyai nilai komersial (Garcia-Pozo *et al*., 1998). Dan pada konstruksi gen, salah satu komponen yang sangat penting adalah promoter.

Promoter adalah bagian dari *DNA dimana* RNA polymerase menempel (bind) dan Fungsi dari promoter ini adalah untuk mengarahkan RNA polymerase sehingga transkripsi akan terjadi pada daerah spesifik (Glick & Pasterna, 2003). Sedangkan menurut Hackett (1993) promoter adalah sekuen *DNA* yang terletak *upstream* (terminal 5') dari lokasi dimulainya transkripsi. Promoter merupakan salah satu penentu / pengatur,

sehingga promoter dapat dianalogikan sebagai *switch* suatu gen. Dengan demikian, promoter dapat dianalogikan seperti *swith* (pengatur) lampu (Yazawa et *al,* 2005). Salah satu hal yang sangat penting di dalam transgenesis adalah pemilihan promoter yang berperan dalam mengatur waktu dan lokasi dimana gen asing yang diintroduksikan harus aktif dan terekspresi. Dm promoter ini ada yang bekerja di semua jenis jaringan/sel (*ubiquotous*) dan ada yang bekerja pada jaringan yang specifik (Hackett,1993) Promoter merupakan salah satu penentu/pengatur spatial–temporal ekspresi gen, sehingga promoter bisa dianalogikan sebagai *swith* suatu gen. Menurut Fletcher dan Davies (1991) jika elemen cis-regulatornya cocok dengan elemen trans-regulator, maka ekspresi gen yng dikendalikan biasanya tinggi, sebaliknya kalau tidak atau kurang sesuai maka ekspresi gen yang dikendalikan akan rendah.

Sedangkan konstruksi gen plasmid yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah konstruksi gen *all-fish* yaitu komponen promoter dan gen GH yang digunakan berasal dari ikan. Konstruksi gen berupa plasmid berisi gen tiGH ikan Tilapia (*Oreochromis niloticus*) dengan promoter β-Actin (mBP) dari ikan medaka (*Oryzias latipes*). Konstruksi gen yang digunakan berasal dari Kobayashi et *al.* , (2007) dan dilakukan perbanyakan gen dengan menggunakan prosedur standar (Sambrook *et al*, 1989).

2.7 Ekspresi Gen

Ekspresi gen merupakan proses kegiatan yang paling esiensial dalam kehidupan suatu organisme, karena ekspresi gen merupakan pengungpakan gen-gen menjadi urutan asam amino pada protein struktural dan protein enzim. Protein struktural menunjang

komponen seluler melakukan fungsinya dan protein enzim mengkatalis perubahan senyawa-senyawa termasuk proses ekspresi gen itu sendiri (Hartikno, 1990) Materi genetik, DNA selalu dalam keadaan aktif. Aktifitas ini tentu saja berhubungan dengan ekspresi gen itu sendiri dan aktifitas tambahan seperti replikasi, perbaikan dan rekombinasi. Ekspresi gen berkaitan dengan proses transkripsi dan translasi untuk mensintesis protein (Toha, 2001). Dan protein inilah nantinya yang akan jadi karakter fenotipe tertentu bagi organisme.

2.8 GFP Sebagai Marker Biologi

Green Fluorescent Proteins (GFP) adalah sekelompok protein dengan struktur mirip satu sama lain yang berpendar hijau apabila dipapar dengan ultraviolet. Protein ini pertama kali diisolasi dari ubur-ubur *Aequorea victoria* yang mampu memendarkan cahaya hijau pada tahun 1962 oleh Osamu Shimomura (Anonymous, 2008b).

GFP adalah protein yang merupakan polimer dari 238 asam amino dengan berat molekul sekitar 27 kilo dalton. Di dalam protein ini ada gugus yang disebut *chromophore* yang berperan sangat penting dalam proses perpendaran hijau. *Chromophore* ini adalah kelampok tiga residu asam amino di posisi 65 (Serin), 66 (Tirosin), dan 67 (Glisin). Ketika dikenai energi cahaya biru atau UV maka pada gugus ini akan terjadi reaksi oksidasi. Energi yang diserap membuat elektron-elektron di dalam gugus ini tereksitasi (yaitu penambahan tenaga pada suatu sistem yang mengalihkannya dari keadaan dasarnya ke suatu keadaan dengan tenaga yang lebih tinggi) dan menghasilkan energi yang lebih rendah yaitu energi cahaya hijau (Anonymous, 2007). Renilla GFP menyerap panjang

gelombang 320-390 nm dan memiliki puncak eksitasi pada 393 nm dan 473 nm (Anonymous. 2001).

GFP telah diidentifikasi dari cakupan luas coelenterata. Baru-baru ini sejumlah kloning GFP telah dikembangkan untuk mengetahui karakteristik protein terbaik yang berasal dari Jellyfish *Aequorea victoria* dan antozoa jenis *Renilla reniformis* (Felt *et. al*, 2000). Pada penelitian ini digunakan GFP yang berasal dati antozoa yaitu R. *reniformis*. Pemurnian GFP R *reniformis* dilaporkan memiliki karakteristik pasti bahwa ia sebagai alternatif lebih menarik daripada protein *Aequorea* victoria untuk digunakan sebagai sebuah marker biologi. GFP *Renilla* menyerap cahaya dengan koefisien pemadaman 5 kali lipat lebih tinggi dibandingkan tipe *GFP* Aequorea dan 2,5 kali lipat lebih efisien daripada jenis dari Aequorea. GFP *Renilla* mempunyai range yang lebih luas pada stabilitas pH dibandingkan dengan GFP Aequorea dan lebih resisten terhadap bahan organik terlarut, detergen dan protease. GFP *Renilla* hidup dalam larutan sebagai sebuah homodimer yang tidak terurai pada semua konsentrasi. Jadi daerah permukaan yang tidak tertutup kurang *hidrophobic* dan kurang berinteraksi dengan protein lain di dalam sel. GFP Aequorea merupakan homodimer lemah sampai moderat untuk konsentrasi rendah dan sering bersifat *cytotoxic* (Felt *et.* al, 2000).

GFP yang digunakan pada penelitian ini merupakan HSC (Hem shock) GFP yaitu GFP yang diperbanyak dalam plasmid bakteri sel kompeten dengan menggunakan metode kejutan suhu. Menurut Mills (1999) Bakteri sel kompeten (E. Coli) sebagai subjek, dipanaskan pada suhu 42°C, yang tujuannya bakteri masih mampu hidup pada suhu ini. Perlakuan ini dikenal dengan "heat shock *genes*". Tahapan kejutan suhu dibutuhkan untuk mengambilan DNA. Pada suhu diatas 42 °C, kemampuan pengambilan

perkembangannya GFP dengan promoter dari jaringan ikan medaka selanjutnya diproduksi. Hasilnya ekspresi GFP memiliki kestabilan pada ikan zebra transgenik.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan khusus

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan laju pertumbuhan ikan lele dumbo guna memenuhi kebutuhan induk dengan kualitas unggul melalui pembuatan ikan lele transgenik dengan menggunakan sperma sebagai vektor transfer gen.

Tujuan khusus penelitiaa pada tahun pertama ini adalah untuk mengetahui :

a, Optimasi tegangan yang dapat digunakan dalam transfer gen (GFP),

b. Gambaran motilitas dan viabiltas sperma pasca elektroporasi

c. Gambaran Interaksi gen GFP dengan sperma ikan lele,

d. Efektifitas promoter (*mβP)* ikan medaka dalam sperma ikan lele

e. Ekspresi gen GFP dalam embrio dan larva sebagai gene reporter,

3.2 Manfaat penelitian

Transgenesis pada ikan sejauh ini belum pernah dilakukan di Indonesia sehingga bisa dikatakan teknologi transgenesis ini termasuk baru di Indonesia, padahal keuntungan yang bisa diperoleh dari teknologi ini sangat banyak. Beberapa keuntungan diantaranya; meningkatkan laju pertumbuhan, meningkatkan daya tahan terhadap penyakit, mengurangi laju konsumsi oksigen pada ikan, sebagai reaktor untuk memproduksi bahan-bahan yang bersifat komersial maupun yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Saat ini teknologi transgenik memungkinkan untuk transfer DNA eksogenous ke embrio ikan maupun hewan lainnya dengan dua tujuan utama yaitu untuk studi tentang fungsi

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

pengaturan gen selama perkembangan dan manipulasi genetika serta untuk memproduksi galur transgenik yang mempunyai nilai komersial.

Diharapkan dari penenlitian ini dihasilkan suatu metode transfer gen yang lebih baik sehingga berguna nantinya dalam membuat benih-benih unggul Ikan lele dengan tingkat produktifitas tinggi.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. OPTIMASI TEGANGAN ELEKTROPORASI

5.1 Kualitas Sperma Ikan Lele

Kondisi sperma ikan lele yang digunakan pada saat penelitian mempunyai kualitas yang cukup baik, sperma yang diambil dari indukan dengan berat rata-rata 1,15 kg dan didapatkan volume sperma rata-rata yaitu 1,5 ml dengan berat gonad rataanta 6,6 gr (lampiran 5 dan 6), ciri-ciri fisik spermanya yaitu berwarna putih susu dan cukup kental. Menurut Harvey dan Hoar (1979) beberapa karakteristik semen ikan antara lain berwarna putih susu dan berbau khas, produksi spermatozoa setiap gram berat badan, 4000 juta dan motilitas spermatozoa 10 menit di air tawar (lihat lampiran 4).

Dari hasil perhitungan jumlah kepadatan sel sperma ikan lele didapatkan sekitar 5,6 x 10^9 sel/ml dan menurut Dacie dan Lewis (1984) Konsentrasi sperma ikan berkisar ± 3,7-11,9 x 10^9 spermatozoa/ ml cairan, karena untuk ikan yang mampu menghasilkan telur sampai ratusan ribu butir selain konsentrasinya yang tinggi, maka akan membutuhkan volume sperma yang lebih banyak pula (Rustidja, 2000). Kualitas sperma dapat dilihat dari dua parameter yaitu motilitas dan viabilitas sperma.

5.1.1 Motilitas Sperma Kontrol

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh tegangan yang berbeda terhadap motilitas sperma. Sebagaimana diketahui bahwa motilitas sperma

memiliki jangka waktu yang cukup singkat, sehingga dalam hal ini perlu perlakuan yang sangat hati-hati untuk menjaga agar spenna tetap dalam kondisi yang optimal.

Setelah gonad jantan dibedah kemudian direndam dalam Na fis (dengan kandungan 0,9 % *sodium chlorate*) agar tetap dalam kondisi isotonis sebagaimana dikatakan Krazsnai at *al* (1997) bahwa proses pengaktifan sperma dipengaruhi oleh kejutan konsentrasi yaitu perbedaan konsentrasi cairan di dalam spermatozoa dengan lingkungan di luar spermatozoa sehingga menimbulkan pergerakan spermatozoa (*osmotic* shock). Setelah itu sperma dikeluarkan dengan cara gonad diperas agar jaringan gonad tidak tercampur dengan cairan sperma sehingga tidak mengganggu waktu pengambilan sperma dengan mikropipet. Sperma yang sudah dikeluarkan tidak dicampurkan dengan pengencer apapun namun untuk menjaga agar kondisinya tidak berubah, sperma diletakkan dalam tempat tertutup dan dengan kondisi yang dingin (diberi es). Menurut Sin (ZOOl), sperma yang keluar dari tubuh ikan tidak akan bertahan lama, karena kondisinya berubah. Oleh karena itu sperma yang telah ditampung diusahakan mempunyai kondisi yang dapat mendukung kehidupannya dan kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah (Toelihere, 1981 *dalam* Rustidja, 2000).

Sebelum sperma diberikan perlakuan, maka perlu diketahui motilitas sperma kontrol, Dari hasil pengamatan diketahui rata-rata motilitas spenna kontrol sebesar 60%, hal ini sudah menunjukkan sperma tersebut dalam kondisi yang cukup bagus karena menurut Toelihere (1981) persentase motilitas spermatozoa

yang dikatakan kurang baik dalam proses pembuahan telur apabila dibawah 40%, karena sering menyebabkan pembuahan tidak berhasil.

Kualitas sperma dengan tingkat motilitas 60 % dapat dikatakan bagus karena menurut Tabares *(2007)* pada penelitiannya menggunakan ikan *Brycon henni* (ikan air tawar) menunjukkan bahwa pada sperma kontrol memiliki tingkat motilitas *78* % karena dalam cairan seminal plasmanya terdapat ion yang lengkap seperti KCI, NaCl, $CaCl_2$ dan $MgCl_2$. Dan fungsi cairan seminal diantaranya; 1) mengembangkan kapasitas sperma dalam bergerak (Mochida *et al.*, 1999, Ohta *et al.*, 2001) dan 2) mempertahankan motilitas sperma saat bergerak dalam air (Morisawa dan Suzuki, 1980; Scott dan Baynes ,1980).

5.1.2 Viabilitas Sperma Kontrol

Dari hasil pengamatan preparat sperm yang sudah diwarnai dengan eosin-negrosin, diketahui viabilitas sperma yaitu sekitar 85% (lihat lampiran 4). Seperti diketahui bahwa persentase viabititas sperma menentukan kualitas sperma tersebut karena hal itu menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa yang hidup cukup tinggi sehingga dapat meningkatkan keberhasilan proses pembuahan, menurut Anonymous *(1998) dalam* Yulham (2007) dituliskan bahwa prosentase hidup sel spermatozoa dalam sperma yang baik minimal 70%. Semakin besar jumlah viabilitas sperma, maka kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil pada sel telur juga semakin tinggi (Hidayahturrahmah, 2007)

Menurut Rustidja(1 *985) dalam* Hidayaturrahmah (2007) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit. Penambahan larutan fisiologis tidak dilakukan

pada sperma stok (sebelum diberi kejutan) karena mengacu pada penelitian pendahuluan bahwa penambahan pengencer yang mengandung ion dapat meningkatkan suhu (timbul letupan) saat diberi tegangan. Menurut Anonymous *(2006)*. panambahan larutan dengan kandungan ion dapat meningkatkan resisten (ohm) sampel sehingga lama kejutan bertambah dan menimbulkan peningkatan suhu pada sampel, sehingga sampel sperma mati.

Untuk mempertahankan kondisi sperma yang akan diberi perlakuan yaitu dengan menaruh sperma ditempat dingin seperti dikatakan Anonymous *(2006)* bahwa sebaiknya sel yang akan dielektroporasi dalam keadaan dingin supaya viabilitasnya tetap terjaga, karena pada saat kejutan listrik diberikan pada sel dapat menimbulkan panas yang nantinya dapat mengurangi viabilitas sel. Menurut Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000), kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah.

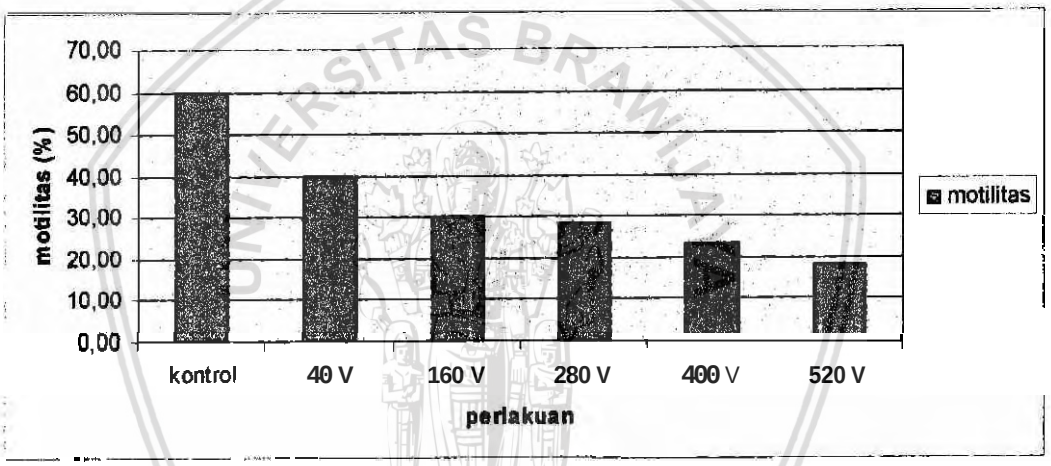
5.2 Kualitas Spermatozoa Pasca Elektroporasi

Setelah sperma diberi kejutan listrik dilakukan penambahan pengencer Na fis, yang bertujuan untuk mempermudah pengambilan sperma karena sedikitnya jumlah sperma (25 µl) yang dimasukkan ke dalam cwet *(2* mm). Selain itu penambahan pengencer juga diharapkan akan membantu mempertahankan kondisi sperma seperti dikatakan oleh Soehartojo (1995) *dalam* Hidayaturrahmah *(2007)*. bahwa pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dapat memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi

yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa

5.2.1 Motilitas Spermatozoa

Dari hasil penelitian diketahui pengaruh pemberian tegangan A(40 V/cm), B(160 V/cm), C(280 V/cm), D(400 V/cm) dan E(520 V/cm) telah menunjukkan hasil yang berbeda terhadap motilitas sperma. Persentase motilitas sperma setelah diberi tegangan dapat dilihat pada lampiran 8.



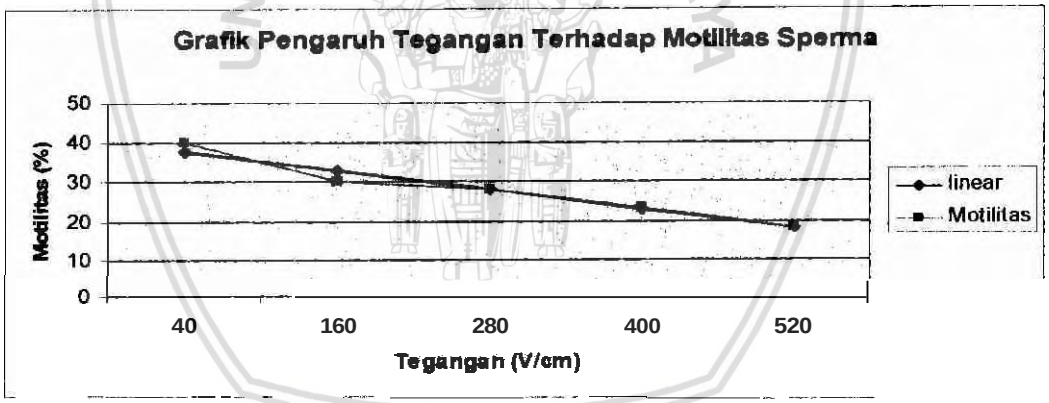
Gambar 1. Grafik Motilitas Sperma

Dari grafik diatas (gambar 11) terlihat bahwa motilitas sperma memiliki kecendrungan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan yang diberikan dan rata-rata motilitas sperma masing-masing perlakuan yaitu; A(40%), B(30%), C(28,33%), D(23,33%), E(18,33%) Hal ini seperti dikatakan oleh Shigekawa dan Dower (1988); O'Hare, (1989) dalam Sin *et al* (1995) bahwa sel sperma cenderung akan mengecil setelah dilakukan elektroporasi (pemberian tegangan tertentu) dan hal ini memungkinkan menurunnya persentase motilitas sperma

Dari hasil sidik ragam diketahui bahwa pengaruh pemberian tegangan terhadap persentase motilitas sperma dapat dilihat pada lampiran 8 Berdasarkan

hasil sidik ragam tersebut didapatkan hasil yang berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian tegangan memberikan pengaruh terhadap persentase motilitas sperma ikan lele

Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dapat dilihat pada lampiran 8, yang menunjukkan bahwa perlakuan A(40V/cm) lebih baik daripada perlakuan C(280V/cm), B(160V/cm), D(400V/cm), E(520V/cm). Seperti dapat dilihat pada gambar 12, grafik regresi menunjukkan bahwa pengaruh pemberian tegangan yang berbeda terhadap persentase motilitas sperma dapat digambarkan dengan persamaan y = 39,198 + (-0,04)x dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,968 yang berarti bahwa hubungan perlakuan kejutan dengan motilitas mempunyai kaitan sangat erat atau hasil motilitas sesuai dengan perlakuan yang diberikan

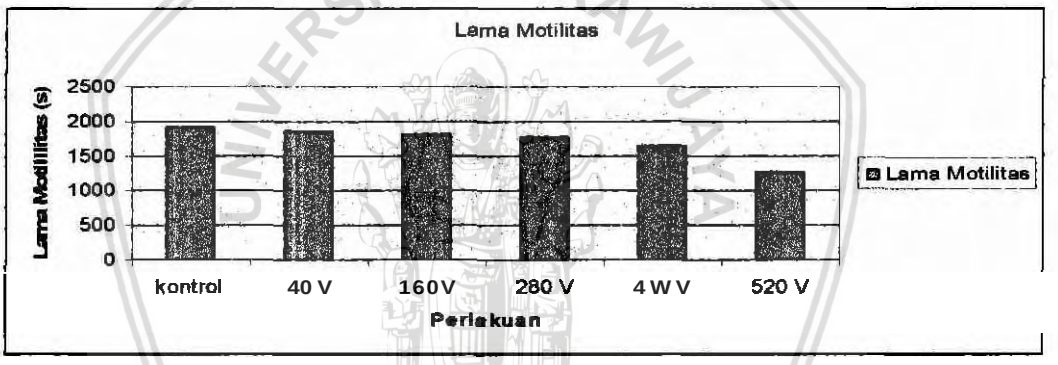


Gambar 2. Grafik Pengaruh Tegangan Terhadap Motilitas Sperma

Pada perlakuan A memiliki jumlah motilitas tertinggi hal ini menunjukkan bahwa sel sperma masih dalam kondisi yang optimal, namun pada tegangan yang lebih tinggi B, C, D. E nilai motilitas sperma semakin menurun

Pada tegangan 40 V/cm memiliki jumlah motilitas tertinggi karena menurut Sun *et al* (2004) pada tegangan 40 Vicm menghasilkan daya tetas dan kelulushidupan udang tertinggi, hal ini menunjukkan bahwa tegangan tersebut menimbulkan kerusakan yang minim pada sel.

Pada gambar 12 menunjukkan bahwa motilitas sperma semakin menurun hal ini sesuai yang dikatakan oleh Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah dan hal mi memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma Selanjutnya Jeyendran (1986) menyatakan, bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolisme sel



Gambar 3 Lama motilitas sperma kontrol dan setelah diberi tegangan

Seperti yang digambarkan pada grafik diatas [gambar 13) bahwa pemberian perlakuan tegangan menimbulkan penurunan waktu motilitas sperma dengan semakin besamya tegangan, jika dibandingkan dengan sperma kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sel sperma yang sudah diberi kejutan listrik mengalami pembukaan pori-pori secara sementara dan terjadi difusi molekul asing ke dalam sel (Knight, 1981. Tsong, 1983, Serpesu *et al.*, 1985; Sowers dan Lieber, 1986; Knight dan Scrutton, 1986 *dalam* Sin 2001) dari pendapat tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran cairan makanan untuk metabolisme spermatozoa dengan cairan di luar sel sehingga hal ini menyebabkan menurunnya

waktu motilitas seperti dikatakan Soeparna (1980) *dalam* Hidayaturrahmah (2007), pergerakan spermatozoa memerlukan energi seperti halnya pada sel-sel hidup lainnya.

Namun penurunan waktu motilitas tidak terlihat signifikan karena dilakukan penambahan Na fisiologis seperti menurut Soehartojo (1995) *dalam* Hidayaturrahmah (2007). pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas spermatozoa.

5.2.2 Viabilitas Spermatozoa

Hasil pengamatan viabilitas pada sperma yang telah diberi tegangan, dapat dilihat pada tabel 1 dan lampiran 5.

Tabel 2. Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Lele

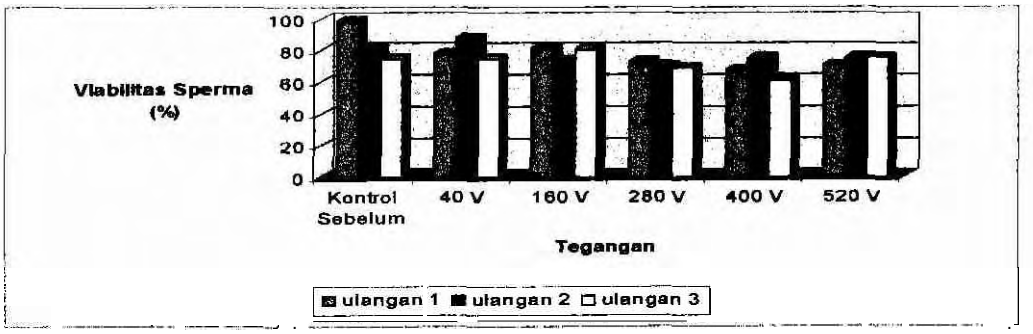
Perlakuan	Ulangan (%)			Rata-rata (%)
	1	2	3	
40 V	78	87,5	74,5	80,00
160 V	81,5	73,5	80,5	78,50
280 V	72,5	70,5	68,5	70,50
400 V	67	75	60,5	67,50
520 V	70,5	75	75,5	73,67
Kontrol Sebelum	99	81,5	74,5	85,00

Dari data pada tabel 1 dapat diketahui bahwa rerata persentase viabilitas yang dihasilkan dari beberapa perlakuan yaitu A (80%), B (78,5%), C (70,5%), D (67,5%) dan E (73,67%), jika dibandingkan dengan viabilitas sperma kontrol (85%) maka terlihat terjadi penurunan.

Penurunan viabilitas pada kebanyakan perlakuan terjadi karena tegangan yang diberikan terhadap sperma dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel

rusak atau pecah dan hal ini memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma (Weaver, 1995), karena menurut Jeyendran (1986) permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan viabilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting peranannya dalam metabolism sel. Ditambahkan oleh Jones dan Stewart (1979) *dalam* Rustidja, (2000) bahwa perubahan infrastruktur pada membran plasma, hilangnya beberapa matrik mitokondria dan penurunan densitas elektron dari matrik mitokondria menyebabkan hilangnya viabilitas spermatozoa

Pada perlakuan dengan tegangan 280 V dan 400 V memiliki nilai viabilitas lebih rendah daripada tegangan 520 V. Hal ini disebabkan karena terjadi peningkatan suhu pada sperma ketika diberi tegangan, hal ini dimungkinkan karena sperma tercampur dengan Na fisiologis (terdapat kandungan ion) saat pengambilan dengan mikropipet. Menurut Anonymous (2006), meningkatkan *resistance* sampel dapat dengan cara 1) mengurangi tempratur sampel, 2) mengurangi kadar ion pada pengencer, 3) mengurangi volume cairan dalam *cuvette* pada kasus media dengan *resistance* rendah. Sehingga apabila sperma (sample) banyak mengandung ion maka resistance dari sampel meningkat sehingga waktu pemberian tegangan semakin lama (pulse length) sehingga suhunya akan meningkat dan menyebabkan sperma mati seperti disampaikan Toelihere (1981) *dalam* Rustidja (2000) kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah.



Gambar 4. Grafik Pengaruh Perberian Tegangan Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Lele Dumbo.

Gambar 14, grafik pengaruh pemberian tegangan terhadap viabilitas sperma diatas menunjukkan terjadinya penurunan persentase viabilitas sperma pada tiap perlakuan dan ulangan namun dari hasil perhitungan sidik ragam (pada lampiran 8) diketahui bahwa pengaruh pemberian tegangan terhadap viabilitas sperma ikan lele dumbo tidak berbeda nyata. Hal mi terjadi dimungkinkan karena metode kejutan yang dipakai yaitu metode square wave karena menurut Chen *et al* (2008) dalam Nakamura (2009) bahwa metode ini menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio.

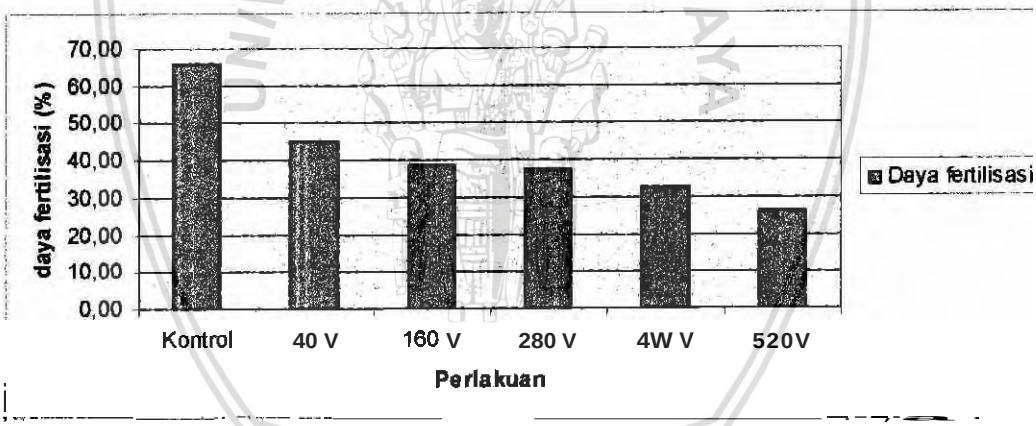
5.3 Daya Fertilitasi Sperma

Setelah sperma diberi tegangan kemudian sperma tersebut digunakan untuk membuahi telur dengan jumlah 0 2 5 g (±*271* butir) dan untuk lebih jelasnya daya fertilisasi sperma dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 3. Daya Fertilisasi Sperma Ikan Lele Dumbo Setelah Diberi Tegangan

Perlakuan	Ulangan (%)			Rata-rata (%)
	1	2	3	
40 V	47,23	52,77	35,05	45,02
160 V	37,27	43,54	35,05	38,62
280 V	38,01	16,97	57,19	37,39
400 V	26,57	39,85	31,36	32,59
520 V	26,20	26,57	25,83	26,20
Kontrol Sebelum	71,58	65,68	60,52	65,93

Dari data tersebut di atas dapat diketahui bahwa rata-rata persentase daya fertilitasi sperma yang telah diberi tegangan, jika dibandingkan dengan rata-rata daya fertilisasi sperma kontrol terlihat terjadi penurunan. Hal ini berhubungan dengan tingkat motilitas sperma yang menunjukkan adanya penurunan dengan semakin besamya tegangan yang diberikan, seperti dikatakan oleh Ciereszko *et al* (2001) keberhasilan suatu pembuahan telur oleh sperma sangat dipengaruhi oleh motilitas sperma, karena menurut Hidayaturrahmah (2007) keadaan viabilitas yang panjang belum tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi, karena pada keadaan ini spermatozoa sangat membutuhkan banyak energi untuk membuahi sel telur.

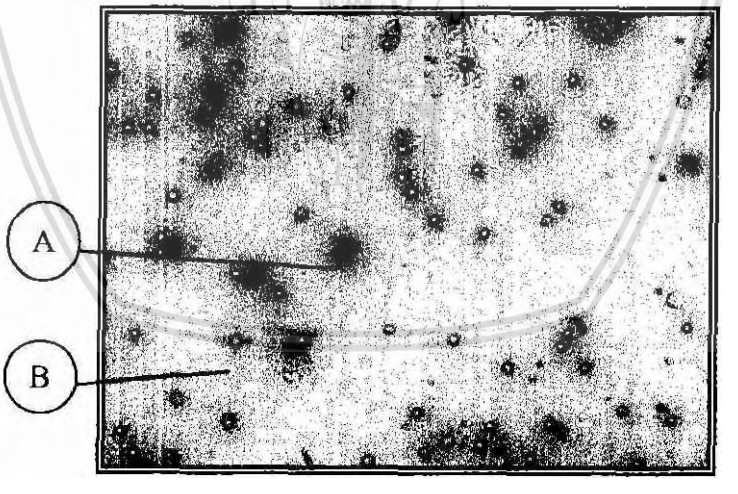


Gambar 5. Grafik Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Daya Fertilitasi

Dan hasil perhitungan sidik ragam (pada lampiran 8) menunjukkan bahwa pengaruh pemberian tegangan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap daya fertilisasi sperma, meskipun terlihat terjadi penurunan seperti ditampilkan pada gambar 15. Menurut Sin (2001), motilitas sperma ikan merupakan parameter kelangsungan hidup sperma, yang akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan. Namun kelulushidupan dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak

tampak perbedaan, dan pada penelitian ini volume sperma yang diberi perlakuan yaitu 25 µl dengan jumlah sel sperma ± 5,6 juta sel/ µl (perhitungan pada lampiran 3) digunakan untuk membuahi 0,5 gr telur dengan jumlah sel selur 4 271 butir.

Hal ini menunjukkan bahwa meskipun motilitas sperma yang cenderung menurun tetapi masih tetap bisa membuahi telur dengan ditunjang jarak pembuahan antara sperma dan telur yang dekat (pemijahan buatan) seperti dikatakan oleh Hidayaturrahmah (2007), kondisi motilitas sperma *slow progressive* mempunyai kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil cukup lemah, pembuahan bisa saja terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat Sperma pada kondisi viabil, kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi sangat kecil yaitu hanya sekitar 10%



Gambar 6 Gambar Sperma setelah diberi tegangan 280V/cm. Keterangan (A) sperma yang mati, (B) sperma yang masih hidup

Kondisi spermatozoa yang bergerak perlahan atau berdenyut di tempat dalam mempertahankan viabilitasnya membutuhkan kecepatan dan energi yang besar untuk masuk ke saluran lubang mikropil sel telur (Hidayathturrahman, 2007)

Namun secara umum sperma yang sudah dielektroporasi masih mampu untuk membuahi karena menurut Sin et *al* (1995) setelah diamati dengan mikroskop elektron, sperma yang diberi kejutan listrik tidak nampak adanya kerusakan namun sel sperma menjadi kerdil dan hal ini yang memungkinkan berkurangnya tingkat motilitas tetapi tidak diketahui apakah sel sperma yang kerdil tersebut masih hidup.

5.4 Daya Tetas Telur (*Hatching Rate)*

Telur yang sudah dibuahi kemudian dipelihara dan diamati (hasil pengamatan dapat dilihat pada lampiran 5 dan *6)* selama 40 jam sampai menetas (gambar pada lampiran 7) didapatkan data daya tetas telur (hatching *rate*, HR) dari tiap perlakuan sebagaimana ditampilkan pada tabel 4.

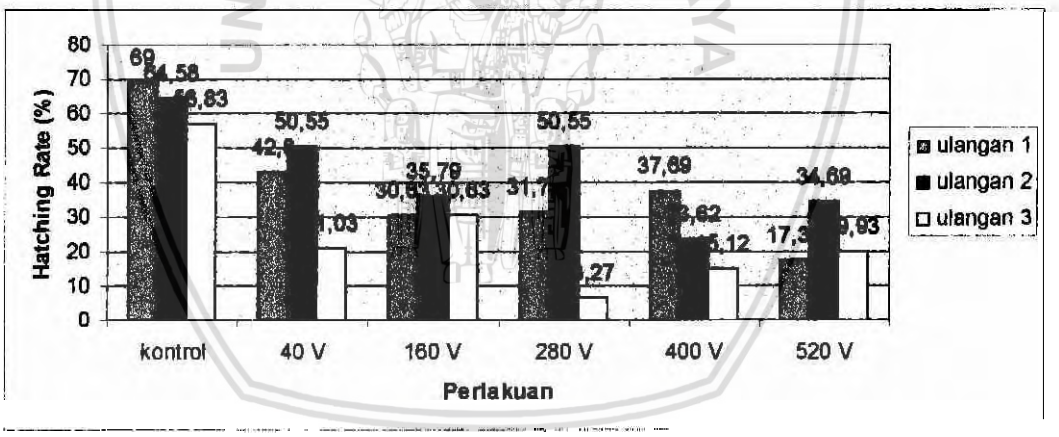
Tabel 4. Daya Tetas Dengan Sperma Perlakuan

Perlakuan	Ulangan (%)			Rata-rata (%)
	1	2	3	
40 V	42,8	50,55	21,03	38,13
160 V	30,63	35,79	30,63	32,35
280 V	31,73	50,55	6,27	29,52
400 V	37,69	23,62	15,12	25,48
520 V	17,34	34,69	19,93	23,99
Kontrol Sebelum	69	64,58	56,83	63,47

Dari tabel diatas diketahui bahwa perlakuan yang mempunyai nilai HR tertinggi yaitu pemberian tegangan 40 V/cm dengan nilai rata-rata 38,13 % hal ini menunjukkan bahwa nilai HR dipengaruhi oleh tingkat motilitas (lihat gambar 8) yang menunjukkan bahwa pada tegangan 40 V memiliki nilai motilitas tertinggi sehingga daya fertilisasinya juga tinggi, menurut Piereszko er *al* (2001) keberhasilan dari suatu pembuahan telur oleh sperma sangat dipengaruhi oleh

motilitas sperma, karena keadaan viabilitas yang panjang belum tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi, karena pada keadaan ini spermatozoa sangat membutuhkan banyak energi untuk membuahi sel telur (Hidayaturrahmah, 2007).

Dari grafik pada gambar 15 dapat diketahui bahwa terdapat beberapa perlakuan yang memiliki nilai HR dibawah 20%, hal ini disebabkan karena rendahnya daya fertilisasi sperma yang dipicu oleh terjadinya peningkatan suhu pada proses pembenan kejutan. Peningkatan suhu yang terjadi pada sperma dalam cuvet yang menyebabkan sperma mati seperti disampaikan Toelihere (1981) *dalam* Rustidja (2000) kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah



Gambar 7. Grafik Daya Tetas Telur

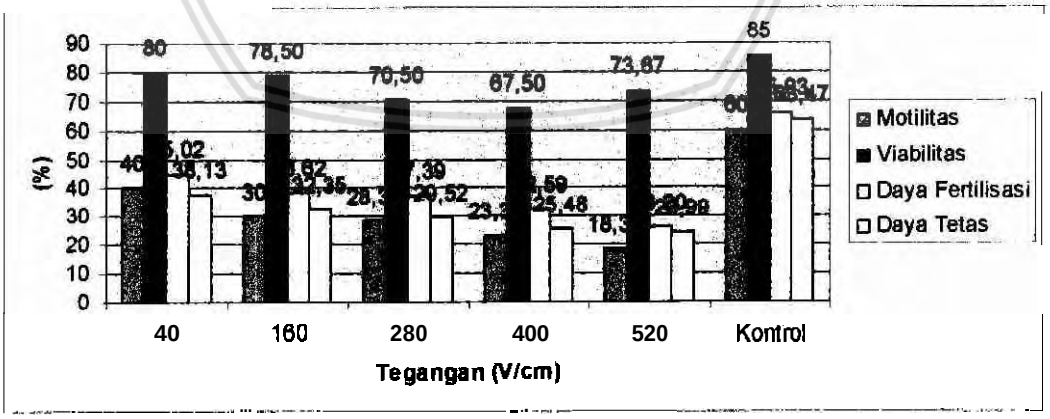
Perhitungan sidik ragam menyatakan bahwa HR yang dibuahi dengan sperma yang diberi perlakuan kejutan listrik tidak nampak perbedaan yang nyata sehingga dapat dikatakan bahwa kemampuan sperma sama dengan sperma normal seperti dikatakan oleh Sin (2001) motilitas dari sperma ikan merupakan parameter dari kelangsungan hidup sperma, disini terlihat akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan. Namun kelulushidupan dari embrio

yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan. Ditambahkan oleh Tsai *et al* (1995) bahwa memang tidak begitu banyak perbedaan daya tetas telur antara yang dibuahi dengan sperma terelektroporasi dan sperma kontrol hanya selisih 4% lebih besar pada sperma kontrol

Hal ini juga tidak terlepas dari metode kejutan yang dipakai yaitu metode ***square*** wave Metode ini dapat menghasilkan tegangan yang besar sehingga efisiensi pemasukkan DNA asing lebih besar karena pembukaan pori relatif lebih besar, namun gelombangnya sangat pendek (*pulse length*) sehingga mencegah sel rusak dan dapat kembali seperti semula karena panas yang ditimbulkan relatif kecil (Chen et *al.*, 2007 dalam Nakamura, 2009).

5.5 Hubungan Antar Parameter

Hasil pengamatan antar parameter dengan tegangan yang berbeda ditampilkan pada gambar 12.



Gambar 8. Grafik Perbandingan Parameter.

5.5.1 Motilitas Dengan Viabilitas Sperms

Dari gambar 18 dapat diketahui bahwa motilitas sperma menurun dengan semakin meningkatnya tegangan yang diberikan, begitu juga dengan viabilitas sperma yang secara umum menunjukkan kecendrungan penurunan.

Selain itu dari gambar tersebut juga menunjukkan bahwa persentase viabilitas sperma lebih tinggi daripada persentase motilitas sperma karena menurut Shigekawa dan Dower (1988); O'Hare, (1989) *dalam* Sin *et al* (1995) sel sperma cenderung akan mengecil setelah dilakukan elektroporasi dan hal ini memungkinkan menurunnya tingkat motilitas sperma. Selain itu sel sperma yang sudah diberi kejutan listrik mengalami pembukaan pori-pori secara sementara dan terjadi difusi molekul asing ke dalam sel (Knight, 1981; Tsong, 1983; Serpesu et al., 1985; Sowers dan Lieber, 1986; Knight dan Scrutton, 1986 *dalam* Sin 2001), hal tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran zat makanan sperma dengan cairan yang ada diluar sel sehingga menyebabkan penurunan motilitas sel sperma, namun viabilitas sperma tetap terjaga karena setelah pori-pori menutup maka sel sperma akan kembali seperti semula.

5.5.2 Motilitas Dengan Daya Fertilisasi Sperma

Hubungan antara motilitas sperma terelektroporasi dengan daya fertilisasi sperma seperti ditampilkan pada gambar 18 menunjukkan bahwa nilai motilitas berbanding lurus dengan nilai daya fertilisasi sperma, pada setiap tegangan. Seperti dikatakan oleh Piereszko (2001), bahwa yang sangat mempengaruhi tingkat keberhasilan spenna yaitu motilitas spenna, karena ketika sel telur mengeluarkan zat *chemoattractants* dalam air maka sperma akan mengikuti sinyal

B. OPTIMASI KONSENTRASI GFP

5.6 Hasil Pengamatan Sperma Kontrol

Pada penelitian ini yang dimaksud dengan sperma kontrol yaitu sperma murni yang tidak diberikan kejutan listrik maupun gen GFP. Pengamatan kualitas sperma kontrol dilakukan 2 kali, yaitu sebelum dan sesudah kegiatan elektroporasi. Kualitas sperma kontrol penting untuk diamati sebagai indikator keberhasilan transfer gen. Kualitas sperma kontrol diamati melalui pergerakan (motilitas) dan daya hidup (viabilitas)nya.

a. Motilitas

Pada hasil pengamatan pergerakan (motilitas) terlihat pergerakan sperma yang cepat ke arah depan dan bergerak melawan arus. Oleh karena itu pergerakan sperma kontrol dikategorikan dalam pergerakan fast progressif. Pada pengamatan persentase sperma yang motil diamati pada kontrol sebelum elektroporasi memiliki nilai lebih tinggi (70%) dibandingkan sperma sesudah kegiatan elektroporasi (65%). Data hasil pengamatan ditunjukkan pada tabel dibawah ini:

Tabel 5. Motilitas sperma kontrol

Motilitas Sperma Kontrol	Motilitas massa	Motilitas Individu
Sebelum elektroporasi	Fast progressif	70%
Sesudah elektroporasi	Fast progressif	65%

b. Viabilitas

Viabilitas sperma diamati dengan menghitung persentase sperma yang mati dan yang hidup setelah diberi pewarna eosin negrosin. Sperma yang hidup akan berwarna transparan sedangkan sperma yang mati akan berwarna merah. Hasil pengamatan daya hidup (*viabilitas*) sperma kontrol menunjukkan sperma

kontrol sebelum elektroporasi memiliki viabilitas yang lebih tinggi (77,37%) dibandingkan kualitas sperma sesudah kegiatan elektroporasi (76,01%). Nilai persentase viabilitas tersebut masih tergolong baik dengan masih banyaknya sperma yang hidup dibandingkan dengan sperma yang mati. Hasil pengamatan viabilitas sperma kontrol disajikan pada tabel dibawah ini:

Tabel 6. Viabilitas sperma kontrol

Viabilitas Sperma Kontrol	Sperma hidup	Sperma mati	Total sperma dalam 1 LBP	Viabilitas (%)
Sebelum elektroporasi	277	81	358	77,37
Sesudah elektroporasi	263	83	346	76,01

Keterangan : LBP = luas bidang pandang

5.6.1 Kualitas sperma perlakuan

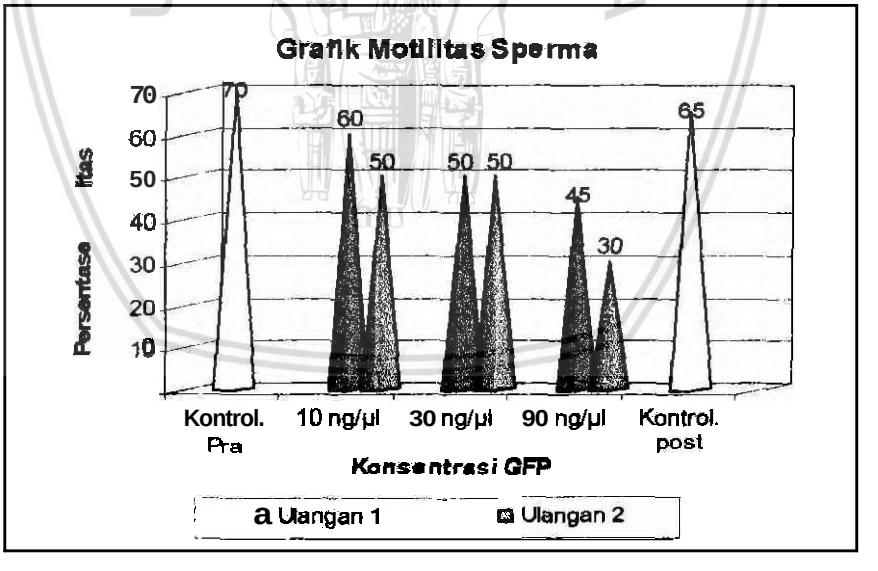
a. Motilitas

Pemberian kejutan listrik (40 volt) dengau metode elektropotasi dan konsentrasi GFP yang berbeda-beda (10ng/µl, 30ng/µl, 90ng/µl) memberikan pengaruh pada tingkat motilitas sperma. Dari hasil pengamatan motilitas sperma perlakuan menunjukkan motilitas tertinggi terdapat pada pemberian GFP dengan konsentrasi paling rendah yaitu 10 ng/µl yang memiliki nilai motilitas rata-rata sebesar 55%. Sedangkan motilitas paling rendah pada konsentrasi GFP paling tinggi yaitu 90 ng/µl dengan motilitas rata-rata 37,5%. Nilai motilitas sperma hasil elektroporasi perlakuan konsentrasi ditunjukkan pada tbael dibawah ini :

Tabel 7 Motilitas sperma hasil elektroporasi

Perlakuan		Ulangan	Motilitas	Rata-Rata
Tegangan	Konsentrasi			
40	10 ng/µl	1	60%	55%
		2	50%	
	30 ng/µl	1	50%	50%
		2	50%	
	90 ng/µl	1	45%	37,5%
		2	30%	

Dari tabel diatas dapat dijelaskan bahwa pemberian tegangan 40 volt dan gen GFP dengan konsentrasi yang berbeda-beda dapat menurunkan nilai motilitas sperma dibandingkan dengan sperma kontrol Selain itu perubahan motilitas sperma juga terjadi pada pemberian konsentrasi GFP yang berbeda-beda yaitu dengan semakin tinggi konsentrasi DNA yang diberikan, nilai motilitas spermanya semakin menurun



Gambar 9 Grafik Motilitas Sperma

Nilai motilitas di atas selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam. Hasil dari perhitungan sidik ragam (table 7) diperoleh nilai F_{hitung} lebih kecil dibandingkan F_{tabel} 5% dan F_{tabel} 1% Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi GFP yang berbeda memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata (non *significant*)

terhadap motilitas sperma. Dengan demikian perhitungan tidak dilanjutkan pada uji BNT.

Tabel 8. Analisa Sidik Ragam Motilitas Sperma Perlakuan

Sumber keragaman	Db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
1.Perlakuan	2	325	162,5	3^{ns}	9,55	30,82
2.Acak	3	162,5	54,17			
TOTAL	5	487,5				

Keterangan: ns = *non significant*

b. Viabilitas

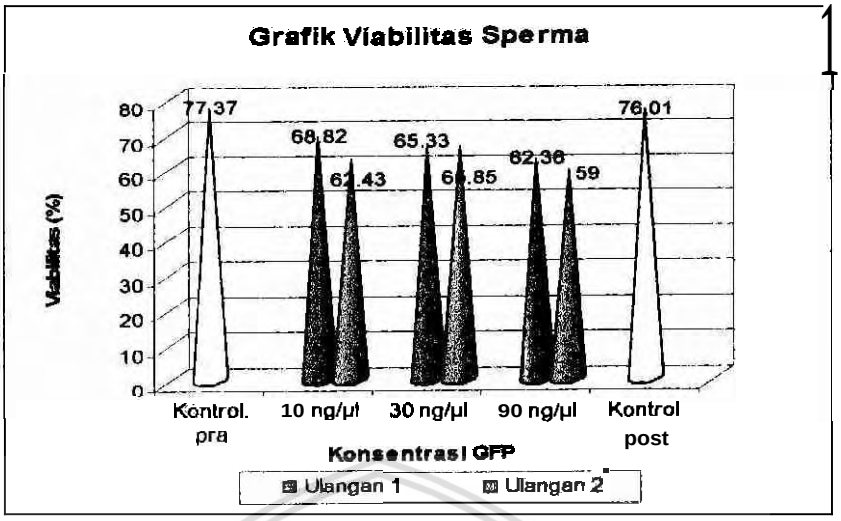
Berdasarkan hasil perhitungan viabilitas sperma perlakuan (tabel 8) didapatkan nilai rata-rata tertinggi pada perlakuan konsentrasi 10 ng/µl sebesar 65,625%, konsentrasi 30 ng/µl rata-rata viabilitas sebesar 65,575%, serta viabilitas paling rendah pada konsentrasi 90 ng/µl sebesar 60,68%.

Tabel 9. Viabilitas sperma hasil elektroporasi

Perlakuan		Ulangan	Viabilitas	Rata-rata
Tegangan	Konsentrasi			
40	10 ng/µl	1	68,82%	65,625%
		2	62,43%	
	30 ng/µl	1	65,33%	65,575%
		2	65,85%	
	90 ng/µl	1	62,36%	60,680%
		2	59,00%	

Dari tabel diatas dapat dikatakan bahwa hasil pengamatan viabilitas sperma yang diberikan perlakuan elektroporasi dengan tegangan 40 volt dan konsentrasi GFP yang berbeda-beda memperlihatkan bahwa sperma perlakuan memiliki nilai viabilitas yang lebih rendah dibandingkan sperma kontrol. Selain itu pada sperma perlakuan, terjadi penurunan viabilitas sperma dengan semakin tingginya konsentrasi yang diberikan walaupun penurunannya sangat kecil. Penurunan tingkat viabilitas sperma secara jelas terlihat pada grafik di bawah ini.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 10 : grafik Viabilitas Sperma

Berdasarkan hasil perhitungan analisa sidik ragam diperoleh bahwa perlakuan konsentrasi GFP yang berbeda memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata (*non significant)* terhadap viabilitas sperma, karena hasil F_{hitung} yang diperoleh masih lebih kecil dibandingkan dengan F_{tabel} 5% maupun F_{tabel} 1%. Dengan demikian tidak perlu dilakukan perhitungan uji BNT. Data perhitungan analisa sidik ragam dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

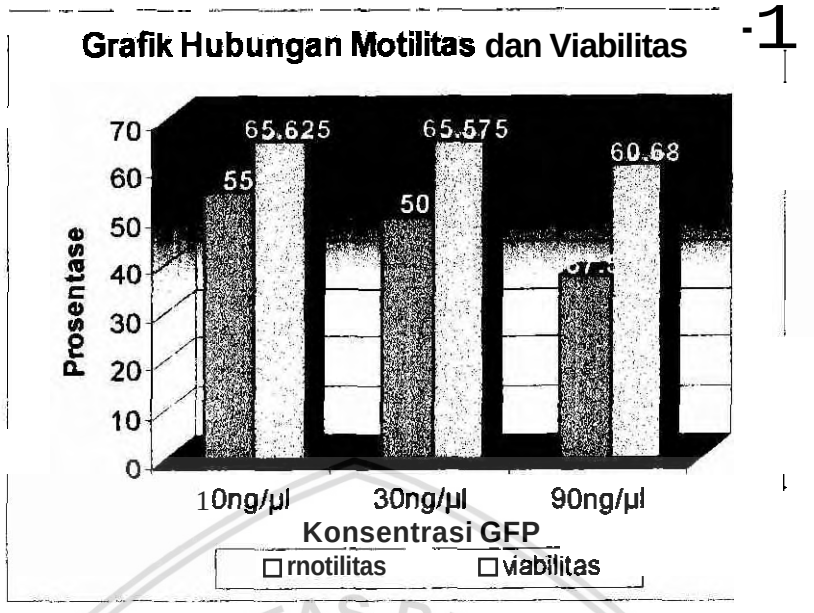
Tabel 10. Analisa sidik ragam viabilitas sperma perlakuan

Sumber keragaman	Db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
1 Perlakuan	2	32,37	16,19	$1,85^{ns}$	9,55	30,82
2.Acak	3	26,20	8,73			
TOTAL	5	58,57				

Keterangan: ns = *non significant*

c. Hubungan motilitas dan viabilitas sperma perlakuan

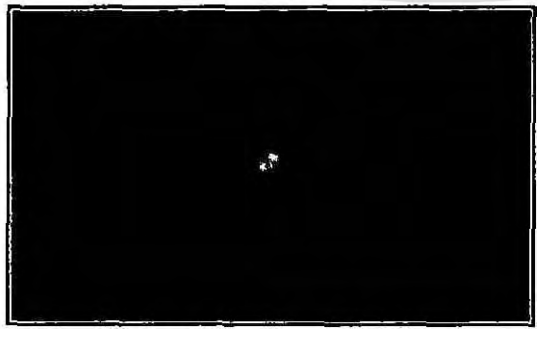
Pada kedua hasil diatas, diketahui bahwa tingginya konsentrasi akan menurunkan viabilitas maupun motilitas sperma. Pengaruh perlakuan tersebut lebih jelas terlihat melalui grafik pada tabel dibawah ini:



Gambar 11 Grafik hubungan motilitas dan viabilitas sperma

5.6.2 Interaksi GFP pada Sperma

Berdasarkan hasil pengamatan sperma hasil elektroporasi dengan GFP pada mikroskop konvokal terlihat pendaran hijau GFP yang berinteraksi dengan sperma, posisi interaksinya sebagian besar berada pada daerah posterior kepala sperma. Posisi interaksi pendaran GFP dengan sperma terlihat dalam gambar 22



Gambar 12. Posisi interaksi GFP dengan sperma (perbesaran 3200x)

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

a. Pengaruh Tegangan Berbeds dengan konsentrasi Sama

Pada bab sebelumnya telah ditunjukkan hasil pengamatan pemberian kejutan listrik dengan tegangan yang berbeda-beda terhadap seperma. Dan pada kali ini pemberian tegangan berbeda yang dikombinasi dengan konsentrasi GFP yang sama. Perlakuan tegangan dilakukan pada 40 volt, 280 volt, 520 volt dan 1000 volt dengan konsentrasi DNA yang digunakan adalah 90ng/µl. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa GFP &pat berinteraksi pada sperma ikan lele dumbo di semua tegangan yang diberikan (lampiran 2). Namun pada tegangan 1000 volt tampak dengan jelas bahwa sperma telah hancur berkeping-keping.

Pada (lampiran 2) terlihat bahwa intensitas pendaran semakin meningkat dengan semakin tingginya tegangan yang diberikan. Sedangkan sebaran dari pendaran GFP tidak merata. Hal ini terlihat pada gambaran intensitasnya yang tidak merata. Berdasarkan hasil di atas, pada tegangan 280 volt tidak memberikan hasil demikian. Kemungkinan besar hal ini disebabkan timbulnya panas saat diberikan kejutan. Data hasil elektroporasi ditunjukkan pada tabel di bawah ini:

Tabel 11 Kondisi input – output Elektroporasi

Tegangan	Tegangan Keluaran	Pulse Lenght	Interval (ms)	Drop (%)	Keterangan
40 volt	37 volt	0,05	0	0	
280 volt	278 volt	0,05	0	0	
520 volt	507 volt	0,05	0	0	
1000 volt	985 volt	0,05	0	0	

Persentase jumlah sperma yang berinteraksi dengan GFP dihitung dengan perbandingan jumlah sperma yang berinteraksi GFP dan tidak pada satu bidang pandang tertentu. Dari hasil pengamatan yang diperoleh pada tegangan 40 volt jumlah sperma yang berinteraksi dengan GFP lebih banyak dibandingkan

perlakuan tegangan yang lain. Data persentase sperma yang berinteraksi dengan GFP disajikan pada tabel di bawah ini:

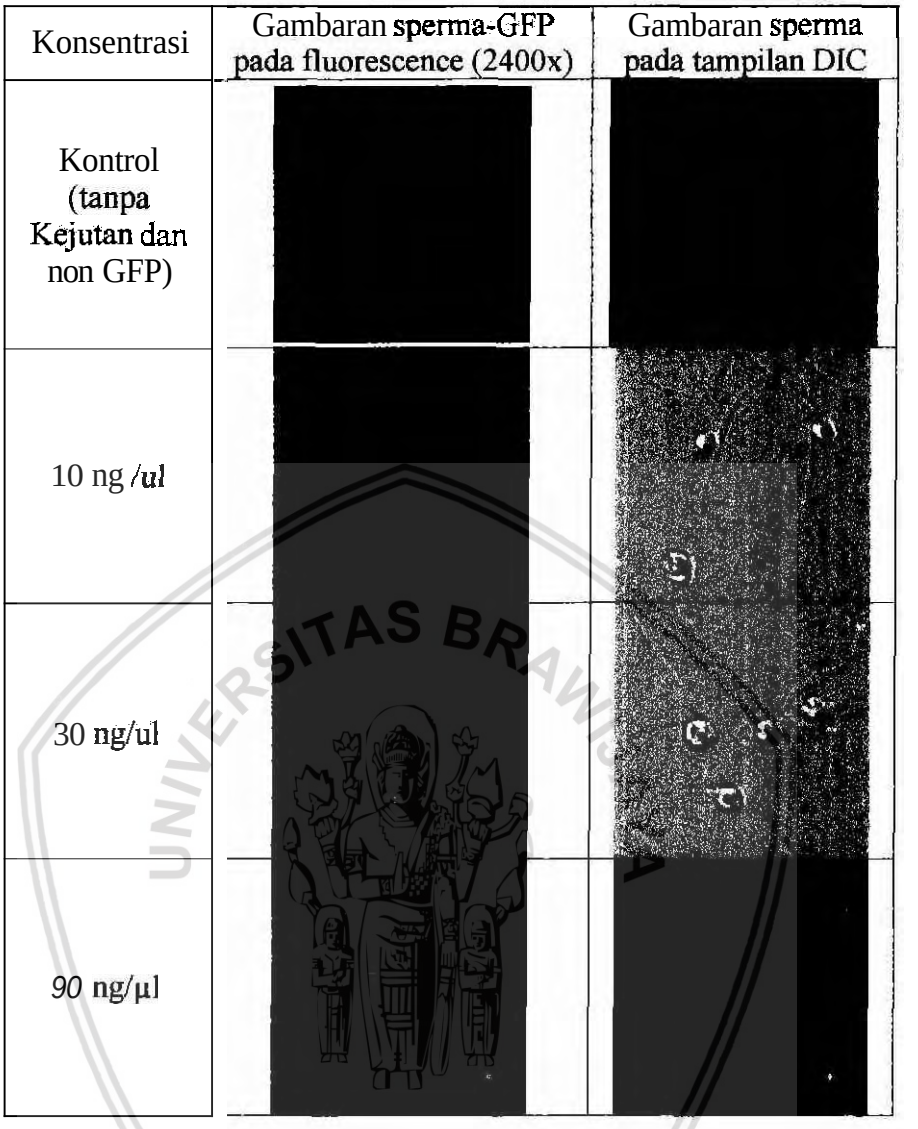
Tabel 12. Tingkat interaksi GFP dengan Sperma

Tegangan	Masuk	Tidak	Rusak	Total sperma yang diamati	Persentase(%)
40 volt	10	4	-	14	71,43
280 volt	14	29	11	54	25,92
520 volt	8	18	4	30	26,67
1000 volt	1	1	Tidak dapat dihitung	-	-

b. Pengaruh Konsentrasi dengan Tegangan sama

Pada perlakuan konsentrasi yang berbeda, didapatkan bahwa GFP mampu berinteraksi pada sperma disetiap konsentrasi yang diberikan. Namun pada konsentasi 10 dan 30 ng/µl intensitasnya sangat rendah bila intensitas laser yang diberikan (HV = 520) dan terlihat hampir tidak berpendar. Namun saat intensitasnya diperbesar (HV = 960) tampak sangat jelas adanya pendaran GFP. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi GFP yang masuk pada sperma sangat sedikit. Data hasil pengamatan interaksi GFP pada konsentrasi yang berbeda ditunjukkan pada gambar di bawah ini :

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

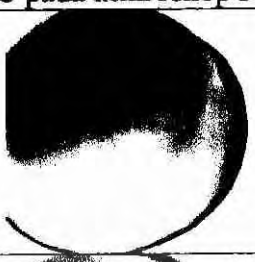
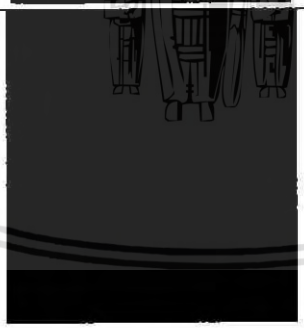


Gambar 13:Perbandingan interaksi GFP-Sperma pada konsentrasi berbeda

5.6.3 Ekspresi GFP pada embrio Lele

Sperma hasil elektroporasi dengan GFP selanjutnya difertilisasikan dengan telur untuk mengetahui apakah sperma masih mampu membuahi telur. Apabila hasilnya telur terbuahi maka perlu diketahui sperma yang membawa GFP yang membuahi telur ataukah yang tidak membawa. Bila telur terlihat berpendar hijau maka yang membuahi telur adalah sperma yang membawa GFP Pada pengamatan telur yang difertilisasikan dengan sperma yang dielektroporasi

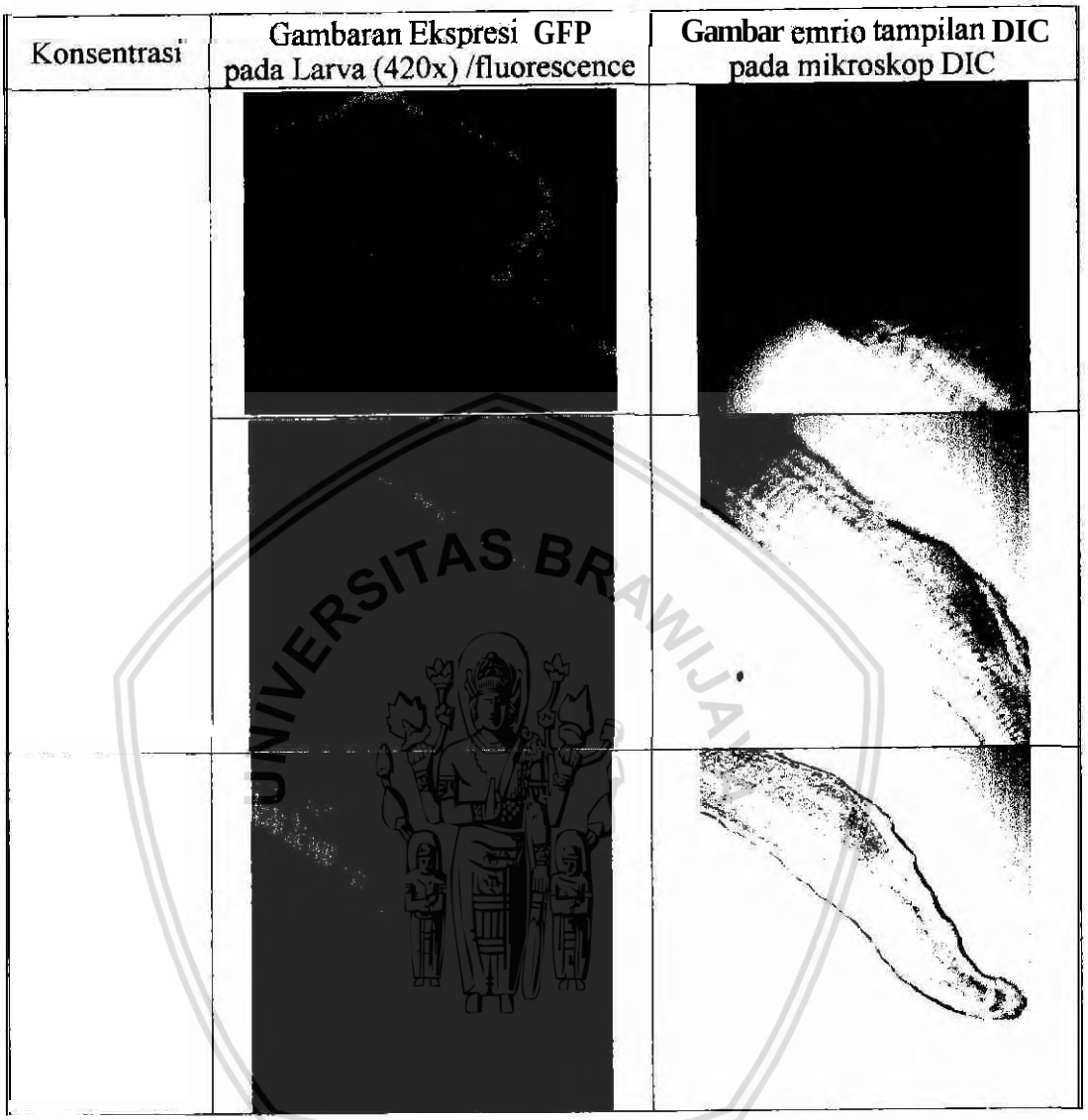
dengan GFP diperoleh hasil bahwa telur berpendar hijau yang merata hampir diseluruh bagian telur. Hasil pengamatan ditunjukkan pada gambar dibawah ini:

Konsentrasi	Gambaran ekspresi GFP pada embrio (10x)	Gambar emrio tampilan DIC pada mikroskop DIC
Kontrol (tanpa elektroporasi)		
10 ng/µl		
30 ng/µl		
90 ng/µl		

Gambar 14 : Ekspresi GFP pada embrio Ikan Lele

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

5.6.4 Ekspresi GFP pada Larva



Gambar 15: Ekspresi GFP pada Larva

Dari gambar diatas terlihat bahwa GFP dapat berekspresi dalam larva ikan lele dan bahkan ekspresinya hampir di seluruh jaringan tubuh larva ikan lele tersebut. Kondisi terseut diatas dicapai pada kondisi elektroporasi dengan 40 V dan konsentrasi GFP sebesar 90 ng/ul. Namun pada bagian lain tingkat intensitas ekspresi GFP pada masing-masing jaringan tidaklah sama.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

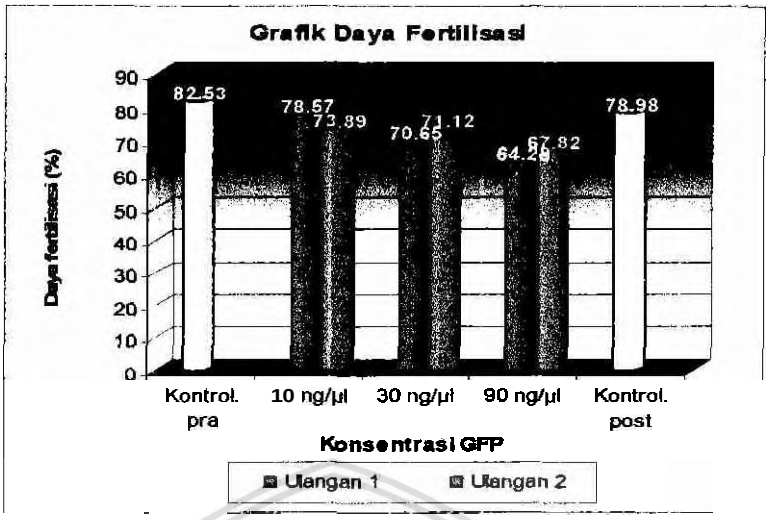
5.6.5. Derajat Fertilisasi

Derajat fertilisasi yaitu banyaknya telur yang terfertilisasi oleh sperma. Jumlah telur yang terfertilisasi terlihat dengan adanya pembelahan dan perkembangan pada telur. Hasil perhitungan jumlah telur yang terfertilisasi oleh sperma hasil elektroporasi dengan gen GFP menggunakan konsentrasi (10 ng/µl, 30 ng/µl, dan 90 ng/µl) ditunjukkan pada tabel 1 di bawah ini:

Tabel 13 : Derajat fertilisasi

Perlakuan	Ulangan		Total	Rata-rata
	1	2		
Kontrol pra Kontrol post	82,53% 78,98%		82,53% 78,98%	-
10	78,57%	73,89%	152,46%	76,23%
30	70,65%	71,12%	141,77%	70,88%
90	64,28%	67,82%	132,10%	66,05%

Hasil fertilisasi telur ikan lele (*Clarias gariepinus)* oleh sperma perlakuan dengan GFP menggunakan tegangan 40 volt dengan konsentrasi GFP yang berbeda-beda menunjukkan adanya penurunan derajat fertilisasi dengan semakin besarnya konsentrasi GFP yang diberikan. Berdasarkan hasil perhitungan nilai derajat fertilisasi, perlakuan dengan konsentrasi 10 ng/µl memiliki nilai rata-rata paling tinggi.



Gambar 16. Grafik Daya Fertilisasi

Setelah hasil derajat fertilisasi dimasukkan pada analisa sidik ragam diperoleh nilai F_{hitung} lebih kecil dibandingkan nilai F_{tabel} 5% dan F_{tabel} 1% Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi GFP yang berbeda-beda tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada derajat fertilisasi Hasil analisa sidik tagam dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 14 Analisa Sidik Ragam Fertilisasi

Sumber keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F5%	FI%
1.Perlakuan	2	103,72	51,86	$8,98^{ns}$	9,55	30,82
2 Acak	3	17,33	5,77			
TOTAL	5	121,05				

Keterangan: ns = *non significant*

5.6.6 Derajat Penetasan Telur

Pada hasil perhitungan derajat penetasan telur pada saat perlakuan tegangan diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 15. Daya Tetas Perlakuan Tegangan

Perlakuan	Tegangan	Konsentrasi GFP	Derajat Penetasan
Kontrol pra	-	-	61,25%
Kontrol post	-	-	60,88%
A	40 volt	90 ng/µl	57,19%
B	280 volt		11,07%
C	520 volt		18,08%
D	1000 volt		12,18%

Sedangkan hasil perhitungan derajat fertilisasi pada saat perlakuan konsentrasi diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 16. Daya Tetas Perlakuan Konsentrasi

Perlakuan	Tegangan	Konsentrasi GFP	Ulangan	Derajat Penetasan
Kontrol pra	-	-	-	46,71%
Kontrol post	-	-	-	25,00%
A	40 volt	10 ng/µl	1	15,04%
			2	24,81%
B		30 ng/µl	1	13,89%
			2	23,73%
C		90 ng/µl	1	12,39%
			2	15,32%

5.7 Pembahasan

5.7.1 Kualitas sperma kontrol

Kualitas sperma kontrol akan mempengaruhi hasil elektroporasi. Karena sperma hasil elektroporasi diharapkan masih memiliki motilitas dan viabilitas yang baik sehingga masih mampu memfertilisasi telur. Menurut Wahyu (2009) fertilisasi dapat didukung oleh kualitas spermatozoa yang baik. Untuk mengetahui tingkat fertilisasi yang lebih tinggi, perlu dicari larutan fisiologis yang dapat menambah daya motilitas dan viabilitas spermatozoa. Menurut Rustidja (1985) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

Sperma sebagai obyek utama penelitian ini sangat diperlukan kualitas sperma yang baik. Menurut Adewumi et.al (2005) Kualitas sperma sangat bervariasi tergantung pada berbagai faktor eksternal seperti pemberian pakan, mutu makanan, dan meningkatkan suhu lingkungan. Kualitas sperma ditunjukkan oleh motilitas dan potensi fertilisasi.

Berdasarkan pernyataan Adewumi diatas menunjukkan bahwa kualitas sperma juga ditentukan oleh kualitas induk. Pada induk jantan sperma didapatkan dengan cara pembedahan gonad. Hasil pembedahan gonad diperoleh jumlah sperma berkisar ± 1.5 ml. Jumlah sperma tersebut diperoleh dari pembedahan gonad pada induk yang memiliki berat rata-rata 936,69 gr dan panjang rata-rata 53.2 cm. Sperma yang dihasilkan oleh ikan jantan beraneka ragam volum dan maupun kualitasnya, hal ini dipengaruhi oleh umur, ukuran dan frekuensi pengeluaran sperma (Kazakou, 1981 dalam Wira, 2007b). Berdasarkan ukuran tersebut induk yang digunakan pada penelitian ini memiliki kualitas yang cukup baik. Menurut Anonymous (2009d) kualitas induk yang baik yaitu: a), umur telah mencapai 1 tahun, b). ukuran berkisar 300-1000 gram/ekor, c). nampak sudah jinak, d). badan mengkilat dan gemuk, e). tubuh sehat dan tidak cacat. Ditambahkan pula oleh Anonymous (2009) ciri induk lele jantan berkualitas adalah berat berkisar 100-200 gr, panjang 20-50 cm serta umur diatas tujuh bulan.

Pengamatan kualitas sperma kontrol sangat penting dilakukan sebagai bagian paling dasar dari kegiatan transfer gen. Kualitas sperma yang baik akan mempengaruhi aktifitas pengikatan DNA oleh sperma. Lavitrano (2006) menyebutkan bahwa pengambilan DNA berkorelasi dengan kualitas sperma. Houdebine (1997) menyatakan bahwa aktifitas pengikatan DNA dipengaruhi oleh

vitalitas spermatozoa, karena DNA tidak berinteraksi dengan spermatozoa mati. Meskipun sperma dihentikan motilitasnya dengan temperatur rendah tidak menghilangkan aktifitas pengikatannya.

a. **Motilitas**

Berdasarkan hasil pengamatan sperma kontrol, kualitas sperma yang digunakan masih cukup baik. Hal ini ditunjukkan dengan pergerakan sperma yang bersifat *fast progressif* dan nilai motilitas sebesar 70% pada kontrol sebelum perlakuan dan 65% pada kontrol sesudah kegiatan elektroporasi dilakukan. Menurut Tolelihere (1981) persentase motilitas sperma dikatakan kurang baik untuk poses fertilisasi bila di bawah 40%. Sedangkan Tabares (2007) mengatakan bahwa prosentase motilitas sperma kontrol setidaknya 78%

Pada nilai motilitas sperma kontrol baik sebelum kegiatan elektroporasi dilakukan dan sesudah kegiatan elektroporasi dilakukan memiliki perbedaan nilai yang tidak begitu jauh. Kemungkinan disebabkan oleh waktu perlakuan yang relatif singkat yaitu 1 jam 23 menit. Menurut Marawali dkk (2001) *dalam* Wahyu (2009) di dalam semen segar, spermatozoa hanya bertahan hidup selama beberapa jam jika derajat metabolismenya tidak ditekan.

b. Viabilitas

Pada pengamatan viabilitas, sperma kontrol juga menunjukkan kualitas yang baik dengan nilai viabilitas 77,37% pada kontrol sebelum dimulai perlakuan dan 76,01% pada kontrol sesudah kegiatan elektroporasi perlakuan. Menurut Yulham (2007) bahwa prosentase sel sperma hidup minimal 70%.

Tidak berbeda jauh dengan nilai motilitas, nilai viabilitas sperma kontrol sebelum dan sesudah kegiatan elektroporasi tidak jauh berbeda meskipun terjadi sedikit penurunan viabilitas kontrol sesudah elektroporasi. Hal ini disebabkan alasan yang sama pada nilai motilitas. Namun sedikitnya penurunan ini menunjukkan adanya penurunan kualitas sperma seiring lamanya rentang waktu setelah spenna keluar dari gonad. Menurut Rustidja (2000) kemampuan hidup sperma sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan lebih lama hidup dalam suhu rendah.

5.7.2 Kualitas sperms perlakuan

Kualitas sperma hasil perlakuan juga sangat menentukan keberhasilan kegiatan transfer gen GFP ini. Alasannya, setelah sperma diberikan perlakuan selanjutnya difertilisasikan dengan telur, tujuannya untuk mengetahui integrasi GFP pada embrio sehingga dibutuhkan spenna yang masih viabil dan motil untuk bisa memfertilisasi telur. Hasil fertilisasi antara telur dan spenna terelektroporasi diharapkan menghasilkan embrio membawa gen GFP yang dimasukkan ke dalam sperma atau dengan kata lain sperma dapat digunakan sebagai vektor untuk membawa DNA asing masuk ke telur saat fertilisasi sebagaimana disebutkan oleh Gandolfi *et.al* (1989) dalam Handarini (2004) bahwa spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit. Dengan demikian akan didapatkan embrio transgenik hasil fertilisasi tersebut, karena adanya pencampuran materi genetis dari keduanya. Menurut Anonymous (2009e) pada fertilisasi terjadi fusi pronukleus jantan dan betina.

repository.ub.ac.id

a. Motilitas

Motilitas sperma hasil elektroporasi dengan GFP menunjukkan adanya penurunan bila dibandingkan dengan sperma kontrol. Hal ini disebabkan elektroporasi dapat meningkatkan panas sel yang diberi perlakuan (Anonymous, 1999). Akibatnya panas tersebut dapat merusak membran sel spermatozoa sehingga menurunkan motilitas spermatozoa. Pernyataan ini didukung oleh Jeyendran (1986) dalam Wahyu (2009) permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Ditambahkan pula oleh Robertis & Robertis (1979) dalam Wahyu (2009) menyatakan bahwa permeabilitas membran erat kaitannya dengan transportasi nutrisi yang diperlukan pada metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Apabila permeabilitas membran sel sperma rusak maka transport nutrisi akan terhambat sehingga ia tidak mampu lagi menghasilkan energi yang menyebabkan pergerakan (motilitasnya) menurun.

Pada perlakuan konsentrasi yang berbeda menunjukkan penurunan motilitas spenna dengan semakin tingginya konsentrasi GFP yang diberikan. Menurut El-Gendy *et.al* (2007) pada konsentrasi DNA yang lebih tinggi akan mengurangi motilitas spenna. Dijelaskan pula oleh Schit *et.al* (1998) dalam Kouznetsov (2008) Konsentrasi DNA yang tinggi menghambat motilitas spermat.

b. Viabilitas

Pada nilai viabilitas sperma perlakuan juga memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan sperma kontrol. Pada sperma perlakuan setelah diberi kejutan listrik dan gen GFP kemudian dilakukan pewarnaan dengan eosin

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Pada hasil penelitian menunjukkan telur kontrol tidak berpendar, sebab sperma yang digunakan untuk memfertilisasi telur adalah sperma murni tanpa campuran GFP. Sedangkan pada telur yang difertilisasi sperma perlakuan 40 dan 520 volt menunjukkan adanya pendaran GFP. Namun pada perlakuan tegangan 280 dan 1000 volt tidak menunjukkan adanya pendaran. Penyebab utamanya adalah kerusakan sel (tegangan 1000 volt) dan matinya sel sperma akbat timbulnya ledakan saat kegiatan elektroporasi dilakukan.

Pada hasil pengamatan integrasi GFP pada telur daerah yang memiliki pendaran paling kuat adalah pada kuning telur. Pendarannya bersifat lebih merata pada seluruh bagian kuning telur. Hal ini menunjukkan tempat integrasi GFP terbesar pada telur adalah pada kuning telur. Menurut.....

5.7.5 Ekspresi GFP pada larva

Integrasi GFP pada larva menunjukkan bahwa semua larva membawa GFP. Hampir semua bagian tubuh larva memendarkan warna hijau GFP yang menunjukkan GFP terintegrasi pada semua bagian tubuh larva. Namun diantara semua bagian itu, daerah kantung kuning telur (*yolksack*) memendarkan warna yang lebih kuat dibandingkan dari daerah yang lain. Menurut Kouznetsov (2008) Dna aasing dapat tereleminasi pada saat perkembangan embrio.

5.7.6 Derajat fertilisasi

Berdasarkan perhitungan derajat fertilisasi juga diperoleh penurunan tingkat fertilisasi walaupun penurunnannya tidak berbeda nyata. Hal ini disebabkan pemberian kejutan listrik saat kegiatan elektroporasi menurunkan motilitas dan viabilitas sperma sehingga kemampuan pembuahannya akan ikut

terpengaruh. Menurut Sin *et.al.*, (2008) kelulushidupan embrio tergantung pada kondisi elektroporasi Hal ini menggambarkan penurunan dalam viabilitas dan kemampuan pembuahan pada sperma yang dielektroporasi.

Fertilitas telur sangat ditentukan oleh tingkat kematangan telur. Menurut Masrizal dan Azhar (2005) dengan semakin banyaknya telur yang mencapai pematangan tahap akhir, maka akan semakin banyak pula telur yang dapat dibuahi oleh sperma, sehingga mengakibatkan prosentase fertilitas telur ikan lele dumbo yang dihasilkan juga meningkat. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan penyuntikan induk dengan menggunakan hormon ovaprim. Ovaprim berperan dalam memacu terjadinya ovulasi (Gusrina, 2008 *dalam* Anonymous, 2009). Dijelaskan pula oleh Michael (2008) Hormon ini berguna untuk melancarkan proses pematangan dan pelepasan telur.

5.7.7 Derajat Penetasan

Berdasarkan data hasil perhitungan derajat penetasan telur diketahui bahwa pada semakin tingginya konsentrasi GFP yang diberikan memiliki nilai derajat penetasan yang relatif menurun. Hal ini berkaitan erat dengan tingkat motilitas dan viabilitas spermanya. Menurunnya motilitas dan viabilitas sperma maka dapat menurunkan derajat' fertilisasinya. Menurut Sin *et.al.*, (2008) kelulushidupan embrio tergantung pada kondisi elektroporasi. Hal ini menggambarkan penurunan dalam viabilitas dan kemampuan pembuahan pada sperma yang dielektroporasi.

Adanya penurunan derajat fertilisasinya maka akan dapat menurunkan derajat penetasannya pula. Menurut Oyen *et al.*, (1991) *dalam* Masrizal dan

Azhar (2005) bahwa prosentase daya tetas telur selalu ditentukan oleh prosentase fertilitas telur, dimana semakin tinggi prosentase fertilitas telur maka akan semakin tinggi pula prosentase daya tetas telur, kecuali bila ada faktor lingkungan yang mempengaruhi seperti perubahan suhu yang mendadak, oksigen dan pH (derajat keasaman).

Kualitas telur yang baik juga berperan dalam keberhasilan penetasan. Telur yang baik akan terus berkembang hingga menetas tanpa ada kecacatan pada larva yang dihasilkan. Menurut Anonymous (2009) definisi kualitas telur yang umum digunakan adalah kemampuan telur untuk menghasilkan benih yang baik. Potensi telur untuk menghasilkan benih yang baik ditentukan oleh beberapa faktor, yakni faktor fisik, genetik dan kimia selama terjadi proses perkembangan telur. Jika satu dari faktor esensial ini tidak ada maka telur tidak berkembang dalam beberapa stadia. Beberapa indikator kualitas telur adalah sebagai berikut:

» Pembuahan atau fertilisasi, merupakan asosiasi gamet, dimana asosiasi ini merupakan mata rantai awal dan sangat penting pada proses fertilisasi. Rasio pembuahan sering digunakan sebagai parameter untuk mendeteksi kualitas telur. Penggabungan gamet biasanya disertai dengan pengaktifan telur. Selama fertilisasi dan pengaktifan, telur-telur ikan teleostei mengalami reaksi kortikal. Kortikal alveoli melebur, melepaskan cairan koloids, dan selanjutnya memulai pembentukan ruang periviteline. Kortikal alveoli muncul setelah terjadinya fertilisasi dan reaksi kortikal yang tidak lengkap menunjukkan kualitas telur yang jelek. Beberapa hal yang mempengaruhi pembuahan adalah berat telur ketika terjadi pembengkakan oleh air, pH cairan ovari, dan konsentrasi protein

» **Morfologi, morfologi sel juga** sering digunakan untuk **meneliti kualitas** telur dan parameter **morfologi** ini **lebih** sensitif dibandingkan dengan **kelangsungan hidup. Pada pembelahan awal (blastomer) embrio** tidak **berdifferensiasi dan** ini menjadi **dasar** untuk perkembangan **embrio selanjutnya.** Kerusakan pada **sel** ini akan **mempengaruhi** perkembangan akhir dari **embrio** dm **akhirnya** akan **terjadi** kerusakan pada **salah satu** sel dalam **perkembangannya. Pengamatan juga** termasuk **melihat simetri pembelahan** awal **serta banyaknya embrio** dan larva yang **cacat.**

Ukuran telur, Ukuran telur mencakup volume **telur,** bobot **basah** dan **bobot kering.** Dari **segi energetika** istilah terbaik untuk ukuran telur adalah **kandungan energi** per telur **atau** joule per telur. **Kalori** telur **menunjukkan** jumlah **energi** yang **tersedia bagi embrio untuk** berkembangan Ukuran telur **berkorelasi dengan** ukuran larva Larva yang besar **lebih** tahan **tanpa** pakan **dibandingkan** dengan larva **berukuran kecil** yang **dipijahkan** dari telut kecil.

5.7.8 Kualitas air media penetasan telur.

Pengukuran kualitas air ***media*** **penetasan** telur yang **dilakukan** meliputi pengukuran suhu, pH dan DO. **Hasil pengukuran** yang **diperoleh kualitas** air tidak **begitu** fluktuatif, dengan nilai suhu antara 24,1°C sampai 24,4°C pada pagi hari **dan 24,5°C** sampai **25,4°C** pada sore **hari.** Nilai pH **antara** 7,25 sampai 7,51 dan DO **antara 4,33 ppm** sampai **5,99 ppm. Nilai kualitas** air pada suhu dan DO *ini* berada **sedikit** di bawah nilai **kualitas air** yang **baik untuk** penetasan **telur** ikan **lele dumbo. Sedangkan** nilai pH masih **berada** pada batas **standart. Menurut** Lindroth **dalam Huisman** (1976) *dalam* **Masrizal dan Azhar *(2005)* mengemukakan pula**

bahwa selama masa inkubasi, telur membutuhkan oksigen terlarut berkisar antara 5,16 – 8,87 ppm. Untuk derajat keasaman (pH), Djatmika dkk., (1986) *dalam* Masrizal dan Azhar (2005) mengemukakan pula bahwa kisaran pH yang baik untuk penetasan telur ikan lele dumbo adalah 6,5 – 8,0. Sedangkan berdasarkan Standart Nasional Indonesia, kualitas air untuk penetasan telur memiliki kisaran suhu: 25 °C - 30°C dan Nilai pH: 6,5 - 8,5.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB IV

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan hal-hal sebagai berlkut:

6.1.1 Optlmasl Tegangan

- Pemberlan tegangan listrik dapat menurunkan tingkat motlllitas sperma lkan lele dumbo (*Clarias spp*);
- Tlngkat motlllitas menunjukkan berbeda nyata antar perlakuan dan perlakuan terbaik yaltu 40 V/cm ;
- Daya fertllisasi sperma menunjukkan penurunan karena adanya kejutan listrik;
- Daya tetas telur yang dibuahi dengan sperma yang sudah dielektroporasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata namun perlakuan yang menghasilkan daya tetas tertinggi yaltu perlakuan 40 V dengan konsentrasi DNA 90 ng/ul.
- Motlllitas dan viabllitas sperma akan semakin menurun dengan semakin meningkatnya tegangan:
- Hubungan rnotlllitas dengan daya fertllisasi sperma adalah berbanding lurus yaltu semakln tinggi motlllitas maka semakln tinggi daya fertllisasi sperrna dan berlaku sebaliknya;
- Daya fertllisasi sperrna berbanding lurus dengan daya tetas telur dan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan ;
- Nilai kisaran kualitas media penetasan telur masih dalam klsaran yang layak untuk menunjang proses perkembangan telur.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

6.1.2 Optimasi Konsentrasi GFP

- Perlakuan konsentrasi GFP yang berbeda-beda menunjukkan bahwa tingkat interaksi terbanyak pada konsentrasi 90 ng/µl
- Posisi interaksi antara GFP dan sperma sebagian besar terletak pada bagian posterior kepala sperma;
- Konsentrasi GFP (90 ng/µl) dengan tegangan 40 volt memberikan ekspresi yang terbaik pada embrio dan larva,

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, disarankan:

- Elektroporasi pada sperma ikan lele dumbo (*Clarias* sp) sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan pada tegangan 40 V/cm dengan 1 kali kejutan dan lama kejutan 0.05 ms.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan metode square wave dengan *exponential* pada voltase yang lebih rendah terhadap motilitas dan viabilitas sperma,
- Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui pengaruh pemberian tegangan 40 V/cm terhadap sperma ikan species yang lain.

repository.ub.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S and Takeuchi T. 2005. Enhancement of EPA and DHA Biosynthesis by Over-expression of Masu Salmon Desaturase-Like Gene in Zebrafish. Transgenic Research.

  Alimuddin, Yoshizaki G., Carman O., dan Sumatadinata K., 2003 aplikasi Transfer Gen dalam Aquakulture. Jurnal Akuakultur Indonesia, 2(1);41-50
- Alimuddin, Goro Yoshizaki, Viswanath Kiron, Shuichi Satoh, Tosio Takeuchi, 2006. Expression of Masu salmon AS-Desaturase –Like Gene Elevated EPA and DHA Biosynthesis in Zebrafish.
- Anathy V, Venugopal T, Koteeswaran R, Pandian TJ and Mathavan S. 2001. Cloning, sequenoing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). J. Biosci 3:315-324.
- Anonymous, 1997. *PCR* Protokol and Reference Guide. PCR Access. Promega Corporation. USA
- Ath.Thar, M.F.(2007) Efektivitas Promoter B-actin ikan medaka dengan Gen penanda hrGFP Pada ikan Lele Keturunan F0, Skripsi, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Arif, Eko, 2008, Laporan Praktikum Fekunditas Ikan Lele Dumbo, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomol, Penerbit, FPUB, 84 h.
- Ayson FG, de Jesus EG, Amemiya Y, Moriyama S, Hirano T and Kawakuchi H. 2000. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol.117:251-259.
- Arezzo, F.,1989 Sea Urchin as a vector of foreign genetic information.Cell.Bio. In.Rep, 13 : 391-404;
- Agrara, T., (1976) Endikrolonogi Umum. Airlangga University Press.Yogyakarta.
- Alam, MS., Popplewell,A., Maclean N., 1996 Germline transmission and expession of a lacZ containing trangene in tilapia (Oreochromis niloticus). Transgenic Research. 5;87-95.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

- Boonanutanasarn, S. Yoshizaki G, Takeuchi Y, Morita T and Takeuchi. 2002, Gene Knock down In Rainbow Trout Embryo Using Antisens Morpholino Phosphorodiaminate Oligonucleotides, Marine Biotechnology4:248-257.
- Bouno, R.J., and P.J.Lunsier, 1992. Transient expressiont of RSVCAT in transgenic Zebra Fish made by electroporation.Mol.Mar.Biol.Biotech. (in press).
- Buckley, KJ. 1979. Relationship Between RNA-DNA Ratio, Prey Density, and Growth Rate in Atlantic Cod (Gadus morhua) Larvae. J. Fish. Res. Board. Can, 30: 195-199.
- Buscker, G.P., I.R. Adelman and E.M. Goolish. 1990. Growth. p: 363-387 in C.B. Schreck and P.B.Moyle. Methods for Fish Physiology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Brown TA. 1991. Pengantar Kloning gen. S.A. Muhamad dan Praseno (editor). Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta.
- Berghman, L.R. Lescroat.O. Roelants I., Olivier F., Kuhn E.R. Verhaert PD, De Loof, A., Van Leuven F., Vandesande, (1996) One Step immunoaffinity purification and partial characterization of hyphophyseal growth hormone from the African Catfish, Clarias gariepinus (Burchel). Com. Bichemia Physiology B.Biochen Mol.Bio.April. 113 (4); 773 -800.
- Calduch-Giner JA, Duval H, Chesnel F, Boeuf G, Perez-Sanchez J and Bouhard D. 2000. Fish growth Hormone Receptor: Molecular Characterization of Two Membrane-Anchored Forms. J.of The Endocrine society, 7:3269-3273.
- Cook, JT,McNiven MA and Sutterlin AM, 2000. Metabolic Rate of Pre-smolt Growt-enhanced Transgenic Atlantic Salmon Salmo Salar. Aquaculture 188 : 33– 45.
- Collas, P Husebeye H and Alestrom P. 2000. Transferring Foreign Genes into Zebrafish Eggs by Microinjection. Transgenic Animal: Generation and Use. p119 - 122
- Cheng, C., KL.Lu., EL Lau., Ts. Yang., CY Lee., JL. Chang, TT Chen and JL Wu (2002) Growth Promotion in Ayu (Plecoglossus altevelis) by Gene transfer of The RainBow Growth Hormone Gene. Zoological Studies 41 (3) ; 303 - 310.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Fletcher,G.L., M.A. Shears, J.J King, P.L. Davies and C.L. Hew 1988. evidence of antifreeze protein gene trnsfer in atlantik salmon. Can.J.Fish. Aquat. Sci. 45;352-357.

- Fujaya, Yushinta, Ir.MSi, 2004, Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan, Penerbit Pt Renika Cipta, Jakarta, 179 hal.
- Friedenrich, H. And M. Scharti, 1990. Transient expression directed by homologous and heterogous promoter and enhacher squences in fish cells. Nucl. Acids. Res 18;3299-3305.
- Felts, K., Rogers, B., Chen K., Ji H, Sorge J and Vailandcourt P. 2001 Recombinat Renella renoformis GFP Displays Low Toxity. Stratagene. 13;85-87
- Glick BR and Pasternak JJ. 2003. Molecular Biotechnology : Principles and Aplications of Recombinant DNA (Third Edition). ASM Press, Washington, D.C.
- Garcia-Pozo, S, Bejar J, Sbaw M and Alvarez MC. 1998. Effect of Exogenous DNA micoinjection on Early Development Response of the Seabream Sparus aurata. Marine Biologi and Bioteknology.
- Gandholi, F., Lavitrano, F., and Camaioni,A. Spadafora, C. Siracusa, G., and Lauria, A. (1989) The use of sperm mediated gene transfer for generation of transgenic pigs. J. Repod. Fertil. Abstr. Ser. 4; 10
- Gagne , MB. Potheir, F., and Sirard.M.A.(1991) Electroporation of Bovine spertozoa to carry foreign DNA in oocyte. Mol.Rep. Dev. 29; 6-15.
- Gong, Z., Wan H., Ju B., Wang X and Yan (2002) Generation of Living Color Transgenic Fish. In.Zhimizu. N.Aoki. T., Hirano,I and Takazima F (eds) Aquatis Genomics. Step Toward a Great Future (pp. 329-339). Springer Verlag. New York
- Guise, KS.,PB Hackett, AR. Kapuscinki, and Faras: 1991. Gene trasfer in Fish.; In Trnsgenics.
- Hackett PB.1993. The Molecolar Biology of Transgenic Fish In Hocahca and Hommesen (eds) Biochemestry and Molecular Biology Of Fishes Vol 2. (pp.218 – 221) elvsevier Publisher BV.
- Hames BD, 1998, Gel electrophoresis of Proteins : A. Practicals Approach, Third Edition, Oxford University Press. New York)

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

- Houdebine, LM., and Chorrout, D., 1991. Transgenic in Fish Experimentalia. 47.891-897.
- Hartikno 1990 Teknik Rekombina DNA , PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta 1990.
- Houlin, D.F, E., Mathers, and A.Foster, 1993. Biochemical correlates of Growth Rate in Fish. P; 45-71
- Hernandes, O., Guillen, I., Estrada, MP., Caberra, E.,Pimentel R., Oina C., Mol.Mar. Biotechnol. et al 1997, ;264-75
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. 1990. PCR Protocols. A Guide in Methods and Application Academic Press Inc. London.
- Inoue, K., Yamashita., Hata, J., Kabeno., S., Asada.1990 Electroporation as new technology for producing transgenic Fish.Cell Dev.29;123-128.
- Inoue, K.,1992 Expression of reporer gene introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. Mol.Mr. Biol.Biotech. 1: 266-270
- Inoue et al(1995)
- Karim, Muhammad Yusri, 2002, Makalah dengan Judul : Upaya Peningkatan Produksi Akuakultur MelaluiAplikasi Teknologi Transgenik (Suatu Kajian Filsafat Ilmu) Prog. Studi / Nrp. : Biologi f G426010031, E-mail : yusrikarim02@yahoo.com
- Kinoshita, M and Ozato K. 1995. Cytoplasmic Microinjection of DNA into Fertilized Medaka *Oryzias latifpes* Eggs. The Fish Biology Journal MEDAKA, 7 : 59 – 64.
- Kobayashi, S. 2006 Over-expression of Growth Hormon Gene in Tilapia Redued Amonia Loading. Thesis. Tokyo University of Marine Scince and Technology, Jepang. (in Japane).
- Kang, HJ., Goro Yoshizaki, Osamu Homma, Charlos A,, Strusmann, Fumio Takashima.1999 Effect of osmotic differential on the effesiency of gene transfer by electroporation of fis spermatozoa.Aquaculture 173 ; 297 -307
- Kobayashi, S. Alimuddin, Morita T., Miwa M. Lu J., Endo M, Takeuchi T. And Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile Tilapia Orechromis Niloticus Over-expresing Growth hormone Show Reduced Ammonia Excretion Aquaculture, 270 : 427

- Koolman J and Rohm KH. 2001. Atlas Berwarna dan Teks Biokimia. Wanadi S.I, Penerjemah; Sadikin M, Editor. Jakarta : Hipokrates, 2000.
- Lavitrano, M., Camoiani,A., Fazio, V, M., Dolci, S., Farace, M., G., and Spadafora, C.(1989) Sperm cells as vectors for introduction foriegn DNA into eggs; Genetic Transformation of mice; Cell 57' 717-723.
- Lavitrano, M., Marcho B., Maria, G.C., Roberto, G., Stefano,M., and Alessia (2006) Sperm Mediated Gene Transfer, Reprod. Fertility and Development 2006, 18, 19-23. CSIRO PUBLSIHING.
- Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Fratti, L., and Spadafora,C.(1992) The interaction between exogenous DNA and sperm cells, Mol.J.Reprod.Des. 31, 161-169.
- Lavitrano,M., Maoni, B., Forte E., Francolini, M., Sperandio, S., Testi, R., and Spadafora, C (1997) The interaction sperm cells with exogenous DNA :a role of CD4 of MHC class II molecules. Exp.Cells Res.233,56-62.
- Lavitrano, M., Forni, M., Bacchi, M.L., Di Stefano, C., Varsi, V., Wang, H., and Seren., E.(2003) Sperm Mediated gen transfer in pigs; selection of donor boars and optimazation of DNA up take.Mol. Reprod. Dev.64.284-291
- Lemaire C and Panyim S. 1993. *Pangasius pangasius* growth hormone mRNA complete coding sequence (*GenBank Accession number* M63713).
- Lemaire C, Writ S and Panyim S. 1994. Giant catfish *Pangasius pangasiodon gigas growth* hormone–encoding cDNA cloning and sequencing by one sided polymerase chain reaction. Gene 49:271-276

  .Li WS, Chen D, Wong AOL and Lin HR. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). J. Endocrinol. 144:78-89.
- Lu, JK, Chen.TT., Chrisman CL. Adriani. OM., and Dixson, JE. 1992. Integration, Expression and Gem Line transmission of Foreign growth hormone gene in medaka. Mol. Mar. Biol, Biotech. 1; 366-375.
- Liu,Z., B.Moav., A.J., Faraz., K.S., Guise, A.R. Kapusenki and PB.Hackett 1990 Development of expression vectors for genetic fish Bio/technology 8;1268-1272.
- Matty AJ. 1985. Fish Endocrinology. Croom Helm London and Sydney Timber Press. Portland, Oregon. 267 h

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

- Magnano, A.R., Giardano, Mascufo, N., Baccetti, B., and Spadafora, C., 1998 ;Sperm.DNA interaction of foreign DNA Sequences in the mouse sperm genome, J. Reprod.Immunol. 41, 197-196.
- Mori, T., Guo, M., W., Shindo, Y., Mori, N., Fukuda, I., and Mori, T., 1990 Expression of Class II major Histocompability Complex antigen on Sperm and its role in fertilisation.Am.J Reprod. Immuno1.24.9-10.
- Muller, F., Ivics, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvart, L., and Maclean, N.(1992) Introducing Foreign gene into fish eggs with electroporated sperms as carrier.Mol.Biol.Biotechnol.I, 276-281.
- Mclean,., N.R.J., and Laight (2000) Transgenis Fish : An evaluation of Benefit and Risks. 146 – 172.
- McPerson, MJ., Quirke P., and Taylor., PCR A practical Approach Oxford. Universitu Press. New York.1991
- Nam YK, Noh, Cho Hj. KN, Kim G. And Kim DS. 2001, Dramatically Accellarated Growth and Extraordinary Gigantism of Transgenic Mud Loac Misgumus mizolepis. Transgenic Research. 10.353 -362.
- Old, R.W. dan S.B. Primorose, 2003. Prinsip-Prinsip Manipulasi Gen, Pengantar Rekayasa Genetik (terjemahan), Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta. 446 h.
- Powers, DA., Hereford,T., TT.Chen., CM., Lin., K., Kight, K. Kreek, R. Dunham (1992) Electroporation as Methode for Transfering genes into the gametes of Zebras Fish, Channel Catfish, and Common carp.Mol. Mar. Biol.Biotech. 1;301-308.
- Patil, J.G., and Khoo,H.W. 1996 Nuclear internalization of foreign DNA by Zebrafish and its enhanchent by electroforation. J.Exp. Zool. 274,121 – 129.
- Peres, S., Solano, R., Castro, F.O., Lionart, R., Martinez, R., Anguiler, A., Herera, L., De La Fuante, J. 1991. Sperm cells mediated gene tansfer in cattle. Biotechnologia Aplicada. 8.90-94.
- Pinkert, 1994. Transgenics Animals Technology.academic Press. Inc. New York Pp. 297-313
- Res, A.R. dan M.J.E., Stenberg, 1984, From Cells to Atoms, An Ellustrated Introduction To Molacular Biology. Blackwell Sceintific Publication, 94

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

- Retnoningrum, 2001 Bioteknologi Molekul dari gen ke Protein, Workshop KPP Bioteknologi Bandung ITB.
- Rustija, 1999 Perbaikan Mutu Genetik ikan Lele Dumbo dan Cryoconservasi Prosiding Pertemuan Perekayasaan Teknologi Pembenihan Agribisnis Ikan Air Tawar, Payau dan Laut Direktorat Jenderal Perikanan. Departemen Pertanian Jakarta.
- Saanin H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Bina Cipta, Bandung. 256 hal
- Sambrook, J., Friesh, and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning Laboratory Manual. Second Edition, Vol. 3 Cold Spring Harbord Laboratory Press, USA Suharsono. 2000. Dasar-dasar Pengklonan Gen : Kumpulan Bahan Kuliah Dalam Pelatihan Peningkatan dm Keterampilan Teknisi Laboratorium Biologi Molekuler. Bogor, 29-11 Maret 2000. Kerjasama Proyek Pembinaan Kelembagaan Penelitian dan Pengembangan Pertanian/ARMP II, Badan Litbang Pertanian, Deptan dengan PAU Bioteknologi, IPB.
- Sin, FYT, At. Bartley, SP Walker, IL., Sin, JE.Symonds., L Hawke, CL.Hopkin (1993) Gene Transfer in Chinook salmon by electroporating sperm in the presence of pRSV-LacZ DNA.Aquaculture 117; 57-69.
- Symond JE., SP., Walker, FYT Sin, IL Sin (1994) Development of mass gen transfer method in chinnok salmon; optimazation of gen transfer by electroporated sperm.Mol.Mar.Biol.Biotech. 3;104-111.
- Symonds, J.E., Walker. S.P., and Sin F Y T. 1994. Electroporation of Salmon sperm with plasmid DNA; Evidence of Enchanned sperms /DNA Assosition. Aquaculture, 199;313 – 327.
- Sokomato, T., Hirano, T., Madsen., S.S.Nisiokha, Bern, H.A. 1995. Insulin-Like growth factor I gene expression during parr-smolt transformation of coho salmon. Zoo. Sci. 12. 249-252.
- Sarmasik, A., Warr. G., and Chen TT., Production Transgenic Fish With elevated levels of Innet devense Activity to bacterial Pathogen.Mar.Biotech. 4;310-322,2002.
- Sarmasik ,A. 2003 Aplication of Gene Transfer Technology for Genetic Improvement of Fish Turk. J.Zool 27 1-6.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

- Sin, FYT. Bartley, S.P., and Sin I.L., Symonds, JE.and Hopkin. C.L. 1993 Gene Transfer in Chinnok salmon by electroporationg sperm in the present of pRSV-lagZ DNA. Aquaculture, 117; 5769
- Shears, A.K., G.L., Fletcher, C.L. Hew.,S., Gauthier, and P.L. Davies.1992 Ttransfer, expression, stable inheritance of antefreeze protein gene in Atlantic salmon.MolMar.Biol.Biotech 1; 58-63.
- Takagi S., Sasado G. Tamiya G, Ozako K, Wakamatsu Y, Takeshita A and Kimura M, 1994. An effisient Expression vector For Transgenic Medaka Construction. Molecular Marine Biotechnology and Biotechnology, 3 ; 192 - 199.
- Toha, Abdul Hamid. A, 2001. DNA, Keanekaragman, Ekspresi, Rekayasa, dan Efek Pemanfaatannya, Seri belajar Biokimia, Penerbit Alfabheta, Bandung

  Tsai, Hj., FS. Tseng., IC Lio (1995). Electopration of Sperm to introduce foreign DNA into the genome of loach Can.J.Fish.Aqual.Sci.52;776-787.
- Trewanas, E. 1982.Tilapias. Taxonomy and Spefiscation. In Pulilin. R.S.V.and Lowe Mc. Connel, RH. The Biology and Culture of Tilapia. ECLARM.Manila. The Philiphines.p. 3-14
- Tsai, HJ., Lai, C., and yang., HS. (1997)sperm as carrier to introduce an exogenous DNA fragment into oocyte of Japanese abalone Trnsgenics Res. 8. 313-315.
- Tamiya, E., T.Sugiyama, K. Masaki, A., Hirose, T.Okoshi, and I.Karube 1990 Spatial Imaging of luciferse gene expression in transgenic fish.Nucl. Acids. Res. 18; 1072.
- Voigt MN and Botta JR. 1990. Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increase Profitability. Paper from the 34th Atlantic Fisheries Technological Conference and Seafood Biotechnology Workshop, August 27 to September 1,1989
- .Volckaert, FA. Hellemans BA, Galbuzera P. And Oliever F 1994. Reppication Expression and Fate Foreigh DNA During Embryonic and Larval Development of The African Catfih Clarias gariepinus. Molecular Marine Biology and Biotechnolgy, 3(2) 57-69.

Lampiran 1 : Prosedur Perbanyakan Konstruksi Gen

Perbanyakan konstruksi gen ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut : 1) Pembuatan sel kompeten, 2) transformasi, 3) identiikasi transformasi, dan isolasi palsmid.

Pembuatan Sel Kompeten dan Transforamsi (Metode Suharsono dan Widyastuti, 2006) sebagai berikut:

- Pembuatan sel Kompeten

1. Ambil sebuah koloni bakteri *E.coli DH5α* dart biakan di media SOB dan dikultur dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml LB cair yang mengandung antibiotik ampisilin.
2. Inkubasi biakan bakteri pada suhu 37°C di dalam penggoyang (*enviromental shaker*) 200-250 rpm selama semalam.
3. Ambil 200 ml dan biakan dalam 20 ml LB, inkbuasi selama 2-3 jam dan diukur densitasnya sampai OD_{600} = 0,4 -0,5.
4. Setelah itu ambil biakan bakteri sebanyak 1,5 mi dan masukkan ke dalam tabung eppendorf serta inkubasi di dalam es selama 10 menit.
5. Kemudian bakteri diendapkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 3.000rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
6. Supernatan (cairan) dibuang dan endapannya disuspensikan dalam 495 ul (0,33 volume asal) buffer transformasi (TB) secara hati-hati,
7. Kemudian inkubasi on ice selama 10 menit
8. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C
9. Supernatan (Cairan) dibuang dan endpatan disuspensikan dengan 41.25 µl (0,08 volume asal) buffer transformasi (TB).
10. Kemudian tambahkan DMSO sebanyak 3,3 µl (7-8% volume dari 1/12 volume TB), goyang dan biarkan dalam es selama 10 menit. Bakteri (Sel kompeten) siap ditransformasikan.

2) Tahap selanjutnya tranformasi Sel dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Ambil 50 µl bakteri kompeten dan tambahkan 10 µl DNA dimasukkan ke dalam tabung ependorf dan inkubasi didalam es selam 20 -25 menit.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2. Campuran tersebut diberikan kejutan panes pada suhu 42°C selama 45 detik dan segera masukkan ke dalam es selam 5 menit.
3. Pindahkan tabung pada suhu ruang dan tambahkan 100µl media cair 2X YT.
4. Inkubasi eppendorf pada alat penggoyang dengan kecepatan 250 rpm selama 20 menit pada suhu 37°C.
5. Kemudian ambil sebanyak 100 µl dan sebar pada media LB padat yang mengandung antibiotik (ampisilin).
6. *Untuk menyeleksi* adenya sisipan di dalam plasmid yang mengandung *gen lacZ*, tambahkan 0,1 M IPTG (10 µl/cawan) dan 2 % X-gal (50 µl/cawan) pada permukaan medium.
7. Bakteri yang mengandung fragment yang disisipkan di situs pengklonan *(MCS =Multiple Cloning Site)* di daerah *lacZ*,akan membentuk koloni berwarna putih, sedangkan bakteri yang mengandung piesmid di dalam MCS di daerah lacZ tidak tersisipi fragmen DNA akan menghasilkan koloni berwarna biru.
8. Bakteri yang tldak mengandung plasmid akan mati (tldak membentuk koloni).
9. Kultur diinkubasi semalam pada suhu 370C di dalam inkubator dengan meletakkan cawan petri secara terbalik (media di bagian atas).

3) Kemudlan dllakukan *identifikasi transformasi* dengan cara :

1. Koloni yang *berwarna* putih dllakukan pengujian kembali dengan pembuatan plating koloni dan elektroforesis.
2. Koloni warna putih dad masing-masing bakteri yang membawa plasmid dengan insersi yang berbeda diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dioleskan ke tabung mikro 1,5 ml
3. dan dilanjutkan dengan penggoresan pada cawan agarose 2XYT (A,I,X) untuk membuat master plate.
4. Master plate diinkubasi pada suhu 370C selama 8 jam. Ke dalarn tabung mikro berisi bakteri ditambahkan 10µL buffer cracking (0,2 g saccharosa, 40 µL NaOH 5 M, 50µl SDS 10% dan sisanya SDW hingga larutan menjadi 1 mL), 10 µL larutan EDTA 1 M dan sekitar 2 µl 6X buffer loading berisi KCL 1 M dengan perbandingan volume 1 : 1.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

5. Setelah diinkubasi sekitar 5 menit, dilakukan senttifuse pada kecepatan t3.000 rpm selam 15 menit.
6. Sebanyak 3 koloni bakteri yang membawa insersi kemudian dlambil menggunakan tusuk gigi steril dan disentuhkan ke dalam media cair 2x YT berisi ampisilin.
7. Inkubasi bakteri dilakukan pada suhu 37°C selam 14 jam.

4) Langkah selanjutnya, adalah isolasi plasmid. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan *kit Bio Basi Inc.EZ-10* dengan prosedur sesuai manual sebagai berikut:

1. Bakteri dari setiap tabung kultur dituang ke dalam tabung mikro 1,5 mL.
2. Bakteri diendapkan dengan cara senrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit.
3. Supernatan dibuang dan kedalam tabung mikro berisi pelet bakteri ditambahkan larutan I sebanyak 100 µl, dilanjutkan dengan vortex sampai semua pelet bakteri lepas darl dasar tabung selama 1 menit
4. Kemudlan ditambahkan larutan II sebanyak 200 µl. Tabung dibolak-balik/*inserting* : gerakan membuat angka delapan) 4-6 kali sampai terbentuk gumpalan-gumpalan putih dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 1 menit (jangan divortex, agar terhindar darl kontaminasi DNA).
5. Tambahkan 350 ul solusi III, dan dladuk dengan cara gerakan keatas kebawah (mix gently). Dan inkubasi dalam suhu ruangan selama 1 *menit*;
6. Kemudian sentrlfuse pada kecapatan 12,000 rpm selam 5 rnenit.
7. Supernatan (Step 5) diplndahkan ke tabung (EZ-10),
8. Kemudian *sentrifuse* sekali lagi pada kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit
9. Ulangi langah no.7 dengan kemudian disentrifus dengan kecepatan sama dengan waktu 1 menit untuk memindahkan sisa-sisa residu larutan.
10. Pindahkan kolom berisi plasmid tersebut kadalam tabung mikro volume 1,5 m dan tambahkan 30-50 ul *Elution* Buffer ke bagian tengah tabung tersebut dan inkubasi dalam suhu ruang selama 2 *menit*.
11. Kemudian sentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 *menit*,
12. Kemudlan simpan DNA *plasmid* dalam suhu – 20°C.
13. Kernudlan konsentrasi DNA diukur dengan rnenggunakan mesin DNA/RNA Quant.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Lampiran 2 Prosedur Pengukuran Konsentrasi DNA dan RNA

1. Larutan DNA atau RNA diencerkan terlebih dahulu sebanyak 40 kali (pengenceran 40 X dengan cara 2,5 ul RNA hasil lama, dibilas terlebih dahulu dengan piran O dan tambahkan 97,5 ul)
2. Alat genequant dinyatakan dan kuvet dikeluarkan dari temat penyimpanan lalu dlbllas dengan aquadest
3. Kalibrasi dllakukan dengan mengukur absorbansi pelarut (SDW untuk DNA dan DEPC untuk RNA), dengan memasukkan 80 ul pelarut tersebut ke dalam kuvet. Kemudian kuvet dimasukkan ke dalam alat, lalu di tekan tombot "set ref", hasll pembacaan akan menunjukkan nilai absorbansi 0,000. Dilanjutkan dengan pengukuran konsentrasi DNA atau RNA.
4. Kuvet yang akan digunakan , dibilas terlebih dahulu dengan 20 ul larutan DNA atau RNA yang akan diukur. Setelah itu larutan yang akan diukur dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 80 ul dan kuvet diletkkan di dalam alat
5. Setelah tombol"sampel" ditekan dan konsentrsi larutan sudah terbaca, kuvet dikeluarkan dan dibilas dengan aquadest.

Tahap akhir dari perbanyakan atau kloning gen pengkode hormon pertumbuhan pada ikan Nila merah (Orechromis niloticus) ini adalah meiakukan sekuensing, karena tahapan sekuensing telah dilakukan dari hasil penelitian Kobayashl (2006) dan data dari Bank Gene dengan Accession Number OA7830.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 3 : Panduan Operasional Elektroporator (BIO-RAD)

A. Menghidupkan alat

1. Sambungkan steker alat ke sumber listrik yang sesuai
2. Tekan tombol "tombol (o-)" di samping kanan alat untuk menyalakan alat
3. Muncul tampilan awal pada screen "Home screen*

B. Prosedur Membuat Protokol baru

1. Pada tampilan "home screen" pilih option No.5" User Protocols" dengan cara menekan tombol " 5" pada keypad atau mengarahkan cursor ke nomor 5
2. Tekan tombol enter pada keypad
3. pada tampilan akan muncul 'user directory"
4. pllih nomor yang belum diberi nama user
5. Tekan tombol enter pada keypad
6. Ketikkan nama user
7. Tekan tombol save pada keypad
8. Letakkan cursor dl nama user yang akan digunakan
9. Tekan tombol enter pada keypad
10. Pada tampilan akan muncul Select Method" dengan option :
    1) Exsponential Protocol
    2) Time constant Protocol
    3j Square wave Protocol

    Pilih salah satu yang sesuai dengan parameter hasil yang diinginkan dengan menelaln tombol nomor yang dipilih pada keypad atau mengarahkan cursor ke noor yang dipilih dan ditekan tombol enter pada keypad
11. Isis point di bawah ini sesuai kebutuhan
    1) Voltage (V)
    2) Capacitance (u F)
    3) Risestence (....)
    4) Cuvette (mm)
12. Setelah semua point diisi
13. tekan tombol save
14. Beri nama pada protocol baru yang telah dibuat (1 nama user dapat menyimpan 12 protocol)
15. Tekan enter
16. Tekan tombol enter sekali lagi sehlngga muncul dtail protocol yang digunakan

C. Run Electroporation

1. pada tampllan "home screen" dipilih nomor 4"user protocol" dengan cara menekan tombol "4" pede keypad atau mengarahkan cursor ke nomor 4.
2. Muncul Pre-Set Protocol
    1) Bactetrial
    2) Fungal

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3) *Mammalian*

Pilih salah satu yang **sesuai** dengan **sel** yang dlgunakan dengan **mengarahkan** cursor pada *nomor* yang dipilih (**banyak** pilihan)

3. Tekan tombol enter pada keypad
4. **Dipilih** salah satu dari **12 jenis** *competent* cell yang *muncul* pada tampilan dengan **menggerakkan kursor** ke nomor yang yang dipilih
5. Tekan **tombol** enter pada **keypad**
6. ***Persiapan sampel*** dengan **langkah sebagai berikut** :

1) **masukkan** 5 **ul** plasmld + 25 **ul sperma**
2) buku tutup "shock **Pod**"
3) **pasang** kuvet pada "Shock Pod"
4) **tutup kembali** tutup **shock pod**

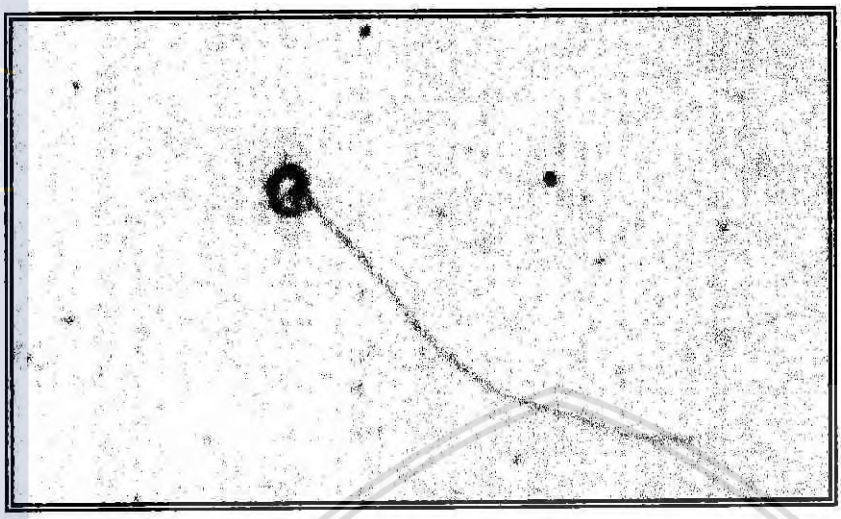
7. **tekan tombol** 'pulse' ***untuk menjalankan electroporation***
8. **Muncul hasil** dengan **tampilan sesuai** dengan parameter yang ***dipilih***

D. **Mematikan alat**

1. **Pastikan kuvet** telah **dikeluarkan dari** Shock pod **dan** tidak ada bahan **kemikalia** yang **tertinggal**
2. Tekan tombol **" Power"** kembali untuk mernetikan **alat**
3. **Cabut** steker alat **dari sumber** tegangan

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 4. Gambar Spenna Lele Dumbo (*Clarias spp*), perbesaran 400 *x*



Ukuran Spenna

- **Diameter Kepala** = ± 19,6 µm
- **Panjang Ekor** = ± 191,3 µm
- **Panjang Total Sperma** = ± 210,9 µm
- **panjang leher** = ± 20,5 µm

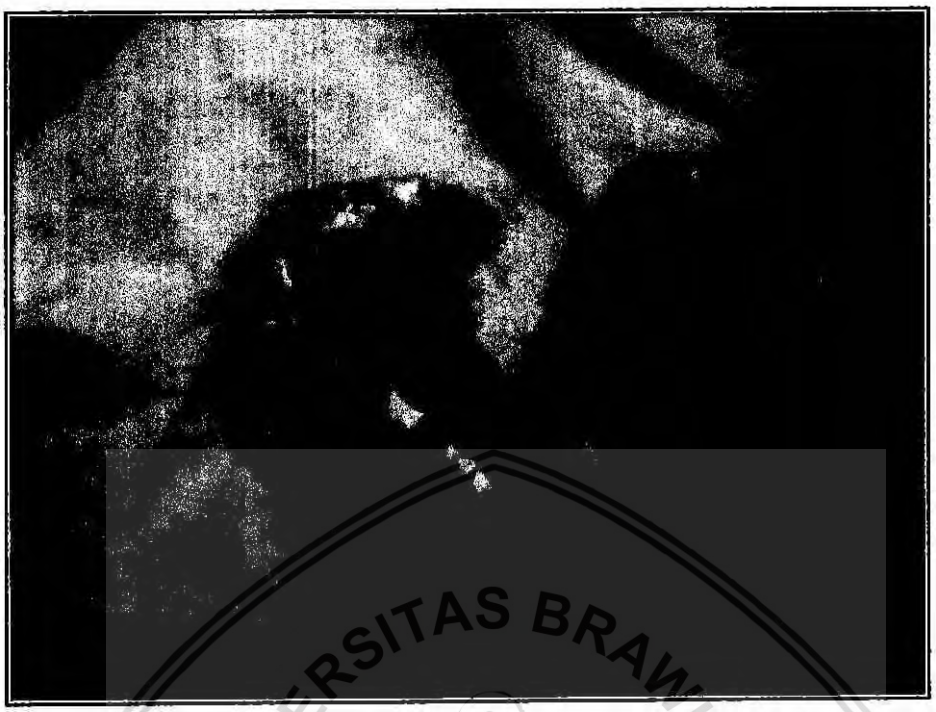
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 6 : Sample Berat Induk dan *Gonad*

No	Berat induk (kg)	Berat gonad (gr)
1	1,37	6,6
2	1,76	6,89
3	1	9,95
4	0,63	1,14
5	1,19	8,8
6	0,95	6,59
Rata-rata	**1,15**	**6,6**

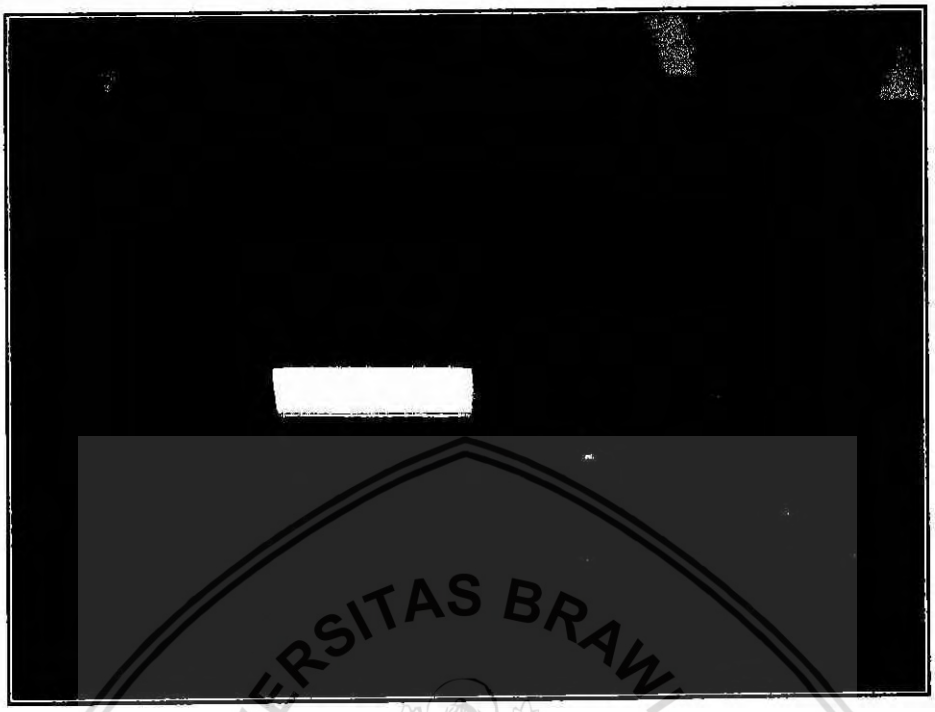
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 6 : Gonad ikan Lele Jantan



repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 7. Gene **pulser** (Elektroporator)



Elektroporator Gene Pulser

Cuvet dengan ukuran 2 mm

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN 8 : Perkembangan Telur Setelah Fertilisasi

	TEGANGAN 40 V/cm	TEGANGAN 160 V/cm	TEGANGAN 280 V/cm	TEGANGAN 400 V/cm	TEGANGAN 520 V/cm
Pukul 20.00					
Fase	Morula	Morula	Morula	Morula	Morula
Pukul 24.00					
Fase	Blastula awal	Blastula awal	Blastula awal	Blastula awal	Blastula awal
Pukul 02.00					
Fase	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula
Pukul 04.00					
Fase	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula
Pukul 06.00					
Fase	Blastula akhir	Blastula akhir	Blastula akhir	Blastula akhir	Blastula akhir
Pukul 08.00					
Fase	Gastrula awal	Gastrula awal	Gastrula awal	Gastrula awal	Gastrula awal
Pukul 10.00					
Fase	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
Pukul 12.00					
Fase	Gastrula akhir	Gastrula akhir	Gastrula akhir	Gastrula akhir	Gastrula akhir

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Pukul 14.00					
Fase	Larva	Larva	Larva	Larva	Larva

1903437

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA