

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (M)



**EFEKTIFITAS PENGGUNAAN GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI
REPORTER GENE DALAM MENDETEKSI EKSPRESI GEN HASIL TRANSFER
GEN MELALUI SPERMA PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)**

PENGUSUL :

KETUA :

Ir.MUCH.RASYID FADHOLI, MS.
NIDN. 0013075202

ANGGOTA :

Dr.Ir.ABDUL RAHEM FAQIH, MSi.
NIDN. 00101067
Ir.ELANA SANOESI, MS
NIDN.0024096305

Dibiayai oleh:
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya
Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan
SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 407/SK/2013 tanggal 2 September 2013

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DESEMBER 2013**

b. halaman pengesahan

Judul penelitian :
Efektivitas Penggunaan Green Fluorescent Protein (GFP) sebagai Reporter gen Dalam Mendeteksi Ekspresi gen Hasil Transfer gen melalui Sperma pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)

Kode/rumpun ilmu : Ilmu Perikanan (230)

Bidang unggulan PT. : Ketahanan Pangan

Topik Unggulan Ketua : Bioteknologi Perikanan

Peneliti :

a. Nama lengkap : Ir. M. Rasyid Fadholi, MS
b. NIDN : 0013075202
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Budidaya Perairan
e. Nomor IIP :
e. Alamat/email : ar.faqih@ub.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama lengkap : Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, MS
b. NIDN : 00101067
c. Perguruan Tinggi : FPIK Universitas Brawijaya

Anggota Peneliti (2)

a. Nama lengkap : Ir. Elana Sanoesi, MS
b. NIDN : 0024096306
c. Perguruan Tinggi : FPIK Universitas Brawijaya

Lama penelitian Keseluruhan : 2 (dua) tahun

Penelitian tahun ke 1

Biaya Penelitian Keseluruhan : 165.250.000,-

Biaya tahun berjalan : Internal PT. Rp.72.500.000,-



Malang, 20 Desember 2013

Ketua Peneliti

Ir. M. Rasyid Fadholi, MS
NIP. 1959207131980031001

Menyetujui
Ketua LPPM UB

Prof. Dr. Ir. Siti Chuzaimi, MS
NIP. 195305141980021001

ABSTRAK

EFEKTIFITAS PENGGUNAAN GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI REPORTER GENE DALAM MENDETEKSI EKSPRESI GEN HASIL TRANSFER GEN MELALUI SPERMA PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Ir.MUCH.RASYID FADHOLI, MS.
Dr.Ir.ABDUL RAHEM FAQIH, MSi.
Ir.ELANA SANOESI, MS

Alternatif teknik transfer gen yang relatif mudah adalah dengan menggunakan vector sperma dengan metode elektroporasi. Sedangkan untuk mendeteksi hasil transfer gen dengan menggunakan reporter gene (GFP). Tujuan kajian ini adalah untuk mengetahui sejauhmana efektivitas Green Flourescent Protein (GFP) sebagai reporter gen dalam proses transfer gen. Metode dengan cara sperma dan gen GFP dimasukkan dalam cuvet yang selanjutnya dilakukan proses elektroporasi (gene pulsar). Sperma hasil elektroporasi diamati untuk diketahui motilitas, viabilitas dan posisi gen GFP. Selanjutnya sperma, embrio dan larva transgen dan non transgen diamati berdasarkan pendaran warna tertentu dibawah mikroskop konvokal, sehingga dihasilkan informasi berupa pendaran dan posisi GFP pada sperma, embrio dan larva. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan fakta sebagai berikut : Gen GFP secara efektif terekspresi pada sperma, embrio dan larva, dengan demikian dapat dikatakan bahwa GFP secara efektif dapat memberikan informasi tentang tingkat keberhasilan proses transgenesis. Pada sisi lain kualitas sperma, telur dan media inkubasi juga menjadi faktor yang sangat penting dalam mendukung keberhasilan proses transgenesis.

KATA KUNCI : Efektifitas, GFP, reporter gen, Elektroporasi, Ikan Mas

RINGKASAN

EFEKTIFITAS PENGGUNAAN GREEN FLOURESCENT PROTEIN (GFP) SEBAGAI REPORTER GENE DALAM MENDETEKSI EKSPRESI GEN HASIL TRANSFER GEN MELALUI SPERMA PADA IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Oleh :

Ir.MUCH.RASYID FADHOLI, MS.
Dr.Ir.ABDUL RAHEM FAQIH, MSi.
Ir.ELANA SANOESI, MS

Alternatif teknik transfer gen yang relatif mudah adalah dengan menggunakan vector sperma dengan metode elektroporasi. Sedangkan untuk mendeteksi hasil transfer gen dengan menggunakan reporter gene (GFP). Tujuan kajian ini adalah untuk mengetahui sejauhmana efektivitas Green Fluorescent Protein (GFP) sebagai reporter gen dalam proses transfer gen, sehingga untuk menghasilkan suatu pengembangan metode dalam bidang bioteknologi guna meningkatkan produktifitas usaha budidaya ikan. Secara umum serangkaian penelitian yang akan dilakukan dapat digambarkan secara ringkas sebagai berikut : setelah sperma dan telur ikan mas diambil dan dipersiapkan, maka proses transfer gene dilakukan berdasarkan metode elektroporasi : sperma dan gen GFP dimasukkan dalam cuvet selanjutnya dilakukan proses elektroporasi (gene pulser). Sperma hasil elektroporasi diamati untuk diketahui motilitas, viabilitas dan posisi gen GFP dalam sperma ikan mas sementara yang lain digunakan untuk membuahi telur yang sudah dipersiapkan, selanjutnya sperma, embrio dan larva transgen dan non transgen diamati berdasarkan pendaran warna tertentu dibawah mikroskop konvokal, sehingga dihasilkan informasi berupa pendaran dan posisi GFP pada sperma, embrio dan larva.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan, nilai motilitas sperma kontrol I 80% dan kontrol II 65% dengan selang waktu $\pm 1,5$ jam (lihat Tabel 1). Nilai persentase sperma kontrol tersebut dalam keadaan bagus dan normal karena menurut Paisal (2008) motilitas sperma kurang dari 40% kurang baik dalam proses pembuahan telur yang menyebabkan pembuahan tidak berhasil.

Dari hasil penelitian diketahui pengaruh perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda terhadap motilitas sperma. Persentase motilitas sperma setelah diberi tegangan dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Pengaruh pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* yang berbeda terhadap motilitas sperma ikan mas (%)

Perlakuan	Ulangan		Jumlah	Rerata (%)
	1	2		
Kontrol I	80	80	160	80
0,5 ms 4x	60	70	130	65
1 ms 4x	75	70	145	72,5
Kontrol II	70	60	130	65

Dari data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa rerata persentase perlakuan elektroporasi lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol. Pada tabel 1 menunjukkan bahwa nilai rata-rata motilitas perlakuan tertinggi terdapat pada 1 ms 4x kejutan (72,5%). *Sin et al.*, (1993) menyatakan bahwa kekuatan ion pada buffer elektroporasi mempengaruhi kelangsungan

hidup sperma. Sedangkan hasil pengamatan mortalitas dan viabilitas sperma kontrol menunjukkan bahwa sperma kontrol I memiliki persentase mortalitas yang rendah (39,17%) bila dibandingkan dengan kontrol II (48,97%). Mortalitas adalah ukuran jumlah kematian pada suatu populasi (Anonymous, 2010f). Mortalitas sperma perlakuan perlu diamati karena hasilnya akan digunakan untuk menentukan tingkat viabilitas dan selanjutnya untuk keberhasilan teknik transfer gen GFP. Alasannya, setelah sperma dielektroporasi kemudian difertilisasikan ke telur ikan mas (*Cyprinus carpio*), maka akan diketahui apakah embrio hasil fertilisasi tersebut mengekspresikan gen GFP atau tidak. Sebagaimana yang dikatakan oleh Gandolfi *et al.*, (1989) spermatozoa merupakan sarana seluler yang spesifik dirancang untuk mentransfer DNA asing ke dalam oosit.

Pada sperma perlakuan, setelah sperma di beri perlakuan dan selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan eosin negrosin, tampak lebih banyak sperma yang mati (lihat Gambar 1). Hal ini terjadi karena adanya kerusakan permeabilitas membran sperma akibat kejutan listrik sehingga menjadi penyebab utama banyaknya jumlah sperma yang mati. Sesuai dengan pernyataan Anonymous (2009e) pada saat elektroporasi, terjadi kejutan listrik selama beberapa milidetik sehingga untuk sementara membuat peningkatan permeabilitas pori-pori di membran sel. Rusaknya permeabilitas membran dan kematian sperma inilah yang menyebabkan sperma banyak yang terwarnai oleh eosin negrosin. Menurut Afriantini *et al.*, (2005) sperma yang telah mati permeabilitas membran menjadi tinggi akibatnya akan mudah terjadi penyerapan warna karena membran plasma yang sudah kehilangan fungsinya.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* memberikan hasil yang berbeda terhadap viabilitas sperma. Persentase mortalitas sperma dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Pengaruh pemberian *Pulse length* dan *Pulse number* yang berbeda terhadap viabilitas sperma ikan mas (%)

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	39,17	-	39,17
0,5 ms 4x	30,69	40,96	35,82
1 ms 4x	54,94	47,05	50,99
Kontrol II	48,97	-	48,97

Dari pengamatan viabilitas pada sperma perlakuan didapatkan waktu viabilitas terlama (tertinggi) pada perlakuan 0, 5 ms 4x yaitu selama 2 jam 30 menit dan waktu viabilitas tersingkat (terendah) pada perlakuan 1 ms 4x yaitu selama 50 menit. Sedangkan menurut Hidayaturrahmah (2007) menyatakan bahwa durasi viabilitas sperma ikan mas yang menggunakan fruktosa sebagai bahan pengencer adalah selama 267, 67 menit (4 jam 46 menit). Penurunan nilai viabilitas sperma banyak dipengaruhi oleh suhu dan kandungan ion selama proses elektroporasi. Pada penelitian ini menggunakan larutan Natrium fisiologis sebanyak 275 µl serta pendinginan kuvet kurang maksimal. Menurut Anonymous (2006) untuk meningkatkan resistensi sampel dapat dilakukan dengan cara : mengurangi temperatur sampel, mengurangi kadar ion pada bahan pengencer dan mengurangi volume cairan dalam cuvette. Elektroporasi adalah penggunaan transmembran kejutan medan listrik untuk mendorong partikel mikroskopis pada pori-pori di bio-membran. Pori-pori tersebut biasa dinamakan 'elektropores'. Hal ini memungkinkan molekul, ion, dan air untuk masuk dari sisi membran yang lain. elektropore terletak di permukaan sel yang paling dekat dengan elektroda. Jika parameter medan kejutan listrik yang diberikan tepat, maka sel dapat pulih (elektropore kembali secara spontan) dan selanjutnya sel dapat tumbuh. Waktu yang diperlukan pori-pori untuk kembali ke bentuk semula yaitu sekitar 1 mikrodetik (Anonymous,

20010c). Parameter penting untuk mendukung keberhasilan elektroporasi adalah tegangan, *pulse length* (waktu yang konstan) dan jumlah kejutan yang digunakan (Weiss, 2007).

c. Fertilitas Sperma

Untuk mengetahui daya fertilitas sperma yang telah dielektroporasi, maka sperma di fertilisasikan terhadap telur. Telur yang terfertilisasi terlihat adanya pembelahan dan kebanyakan berwarna kekuningan. Perhitungan daya fertilitas yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Daya Fertilitas Sperma Ikan Mas

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	50,5	-	50,5
0,5 ms 4x	49,09	40,9	44,9
1 ms 4x	35,54	40	37,77
Kontrol II	46,25	-	46,25

Dari tabel diatas diketahui bahwa fertilitas sperma kontrol memiliki daya fertilitas yang tertinggi baik kontrol pra maupun pasca perlakuan elektroporasi dibandingkan perlakuan. Pada sperma yang dielektroporasi akan mengurangi kemampuan viabilitas dan fertilitas sperma. Karena pada saat analisa sperma yang dielektroporasi menggunakan mikroskop elektron ditemukan ekor sperma yang putus sampai ke mikrotubule filament (Sin *et al.*, 1993).

d. Daya Tetas Telur (*Hatching rate*)

Telur yang sudah terfertilisasi diamati perkembangannya sampai menetas selama \pm 72 jam. Didapatkan hasil daya tetas telur (*Hatching rate*) dari tiap perlakuan tertera pada Tabel 4 dibawah ini.

Tabel 4. Daya Tetas Telur (*Hatching rate*)

Perlakuan	Ulangan		Rerata (%)
	1	2	
Kontrol I	35	-	35
0,5 ms 4x	7,4	71,42	39,41
1 ms 4x	44,73	28,57	36,65
Kontrol II	28	-	28

Dari hasil pengamatan bahwa daya tetas perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan *hatching rate* kontrol. Kualitas telur dan kualitas air media inkubasi sangat menentukan keberhasilan proses penetasan telur. Kualitas telur yang baik dan didukung oleh kualitas air media yang memadai dapat membantu kelancaran pembelahan sel dan perkembangan telur untuk mencapai tahap akhir terbentuknya embrio ikan. Yatim (1990) dan Effendie (1997) menyatakan, salah satu faktor kualitas air yang penting dalam memengaruhi pembelahan sel (penetasan telur) adalah suhu air medium.

e. Intensitas Pendaran GFP Sperma Embrio dan Larva

Dari hasil pengamatan pendaran GFP pada sperma dengan menggunakan mikroskop konvokal menunjukkan bahwa pendaran tertinggi pada perlakuan 0,5 ms 4x dengan nilai intensitasnya 3600 *arbitrary* dibandingkan pendaran perlakuan 1 ms x 4x. Sperma merupakan salah satu gamet yang terlibat langsung dalam proses fertilisasi. Matriks DNA diikat pada daerah *postacrosomal* oleh komponen protein spesifik dan akan bergabung

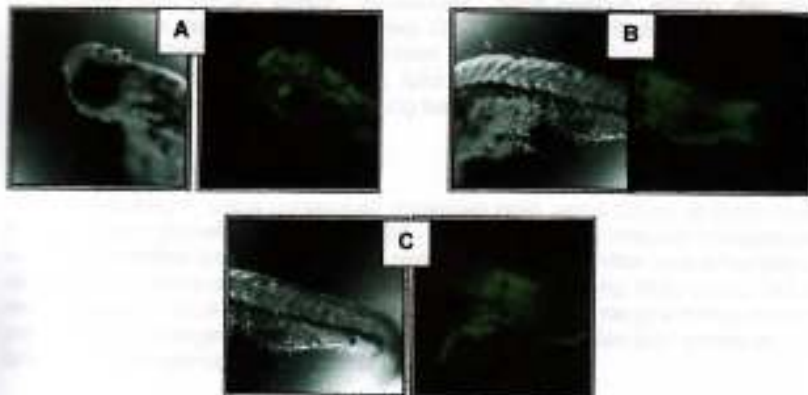
dengan genome induk setelah terjadi fertilisasi (Handarini, 2001). Elektroporasi menjadikan sel sperma mampu menarik molekul DNA lebih banyak dibandingkan spermatozoa yang tidak dielektroporasi (Lavitrano *et al*, 2006).

Ekspresi gen GFP pada embrio

Pendaran GFP tertinggi terdapat pada perlakuan 0,5 ms 4x dengan nilai intensitasnya 4000 *arbitrary* sedangkan pendaran GFP terendah pada perlakuan 1 ms 4x dengan nilai intensitasnya 2500 *arbitrary*. Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa pada semua embrio hasil fertilisasi sperma perlakuan menunjukkan pendaran GFP. Dengan demikian GFP mampu terekspresi pada sel telur sehingga memunculkan warna hijau akibat protein gugus *chromophore*. GFP adalah protein yang mengandung asam amino 238 (26,9 KDa) dari spesies ubur-ubur *Aequorea Victoria* yang bisa berflouresensi warna hijau dengan adanya penyinaran warna biru (sinar ultraviolet). Dengan menggunakan GFP ini maka peneliti bisa mengembangkan cara untuk melacak atau mendeteksi sintesis protein, menentukan lokasi protein tertentu, atau mengetahui pergerakan protein di dalam sel makhluk hidup (Anonymous, 2009f).

2.Ekspresi gen GFP pada larva

Dan pada hasil pengamatan bahwa masing-masing perlakuan memunculkan pendaran dengan tingkat intensitas yang berbeda. Namun pada semua perlakuan telah memperlihatkan bahwa GFP telah berpendar pada semua perlakuan. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Pendaran GFP pada larva perlakuan 0,5 ms 4x kejutan perbesaran 40x
A. bagian kepala
B. bagian perut
C. bagian ekor

Sedangkan ekspresi GFP paling tinggi terdapat pada perlakuan 1 ms 4x dengan nilai intensitas bagian kepala 4000 *arbitrary*, bagian perut 3400 *arbitrary* dan bagian ekor 4000 *arbitrary* (Gambar 1).

Hasil pengamatan diatas menunjukkan bahwa pada larva ikan mas umur 20 jam masih memendarkan gen GFP, dan pendaran GFP tersebut terlihat hampir merata pada semua bagian tubuh (kepala, perut dan ekor). Kestabilan ekspresi gen ditentukan pula oleh konstruksi gen, pada penelitian ini berupa konstruksi plasmid sirkuler dengan β -actin medaka sebagai promotor dan hrGFP sebagai gen target. Menurut Hackett (1993) salah satu

hal yang penting dalam kegiatan transgenesis adalah pemilihan promotor yang berperan mengatur waktu dan lokasi dimana gen asing yang dimasukkan dapat aktif dan berekspresi. Promotor ada yang bekerja pada jaringan spesifik dan ada pula yang bekerja pada semua jaringan. Menurut Alimuddin (2009) promotor sebagai regulator ekspresi gen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan transgenesis. Promotor β -actin memiliki aktivitas tinggi pada jaringan otot.

4.8 Kualitas Air

- a. Suhu
Selama masa inkubasi telur sampai menetas, dilakukan pengukuran suhu. Suhu dalam bak inkubasi berkisar antara 26-27°C.
- b. pH
Derajat keasaman (pH) pada bak inkubator selama masa inkubasi yaitu 7,8.
- c. Oksigen Terlarut

Nilai oksigen terlarut pada air media inkubasi telur yaitu sebesar 6 ppm.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan ini dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Gen GFP secara efektif terekspresi pada sperma, embrio dan larva, dengan demikian dapat dikatakan bahwa GFP secara efektif dapat memberikan informasi tentang tingkat keberhasilan proses transgenesis.
2. Pada sisi lain kualitas sperma, telur dan media inkubasi juga menjadi faktor yang sangat penting dalam mendukung keberhasilan proses transgenesis.

Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut terkait aplikasi pengembangan deteksi dalam proses transgenesis ini. Pengembangan metode transgenesis ini akan sangat bermanfaat dalam mendukung peningkatan produktivitas usaha budidaya perikanan, dengan cara membuat ikan dengan kecepatan tumbuh yang lebih cepat, dan teknologi ini memungkinkan untuk menghasilkan hal tersebut. Dalam rangka menyempurnakan serta untuk mencapai target penelitian tahap I ini, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan pada tahun ke 2 sebagaimana bagan alir di bawah berikut ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Afandi, R. & Tang, U.M. 2000. Biologi Reproduksi Ikan. Laporan. Pekanbaru: Pusat Penelitian Kawasan Pantai dan Perairan.
- Alimuddin, MH, Fariduddin Ath-thar, Lola Irma Purwanti, Odang Carman. 2009. Promotor β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dapat digunakan untuk Membuat Ikan Lele dan Ikan Mas Transgenik.
- Baibakov, Boris, Lyn Gauthier, Prue Talbot, Tracy L. Rankin and Jurrien Dean. 2007. Sperm Binding to the Zona Pellucida is not Sufficient to Induce Acrosome Exocytosis. Research Article. 933-943.

- Dunham, Rex A. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology*. Department of Fisheries and Allied Aquacultures. Auburn University. Alabama. USA. Halaman 161-165
- Fariduddin, Muhammad Hunaina Ath-thar., Komar Sumantadinata., Alimuddin dan Rudhy Gustiano. 2009. Efektivitas Promoter β -actin Ikan Medaka (*Oryzias latipes*) dengan Penanda Gen hrgfp (*humanized renilla reniformis green fluorescent Protein*) pada ikan Lele (*Clarias gariepinus*) Keturunan f0.
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa. Progam Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lambung Mangkurat. BIOSCIENTIAE. Volume 4, Nomor 1, Januari 2007, Halaman 9-18.
- Lavitrano, M., Marco Busnelli, Maria Grazia Cerrito, RobertoGiovannoni, Stefano Manzini and Alesia Vargiolu. 2006. Sperm Mediated Gene Transfer.
- Maerizal dan Efrizal. 1997. Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertisasi Sperma dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Fisheries Journal Garing* 6: 1-9.
- Prasher, D.C, M. Chalfie, Y.Tu, G. Euskirchen, WW. Ward. 1995. Green Fluorescent Protein as a marker for Gene Expression. *Science* 263 : 802 – 805
- Rustidja. 1985. Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan. Fisheries Project Unibraw. Malang.
- Suyadi dan N. Isnaini. 2003. Pemanfaatan Sari Buah Pisang sebagai Bahan Pengencer Semen Kambing. *Jurnal Ilmu Hayati* Vol 15 No 1 halaman 5-10
- Toelihere, Mozes R. 1981. Inseminasi buatan pada Ternak Angkasa, Bandung. Halaman 1-122.
- _____. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. bandung
- Tortora, Gerard J. 2001. *Microbiology: An Introduction*. USA: Addison Wesley Longman Inc.
- Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of Cell Membrane. *Biophysical Journal*. Volume 60 halaman 297-306
- Jeyendran RS, Zaneveld LJD. 1986. *Instruction influences for Hypoosmotic Swelling (HOS) Test*. Short Course Reproduction / Andrology and Non Hormonal contraception. Chicago.