

TRANSMISI TRANSGEN GLIKOPROTEIN DAN KETAHANAN IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) TRANSGENIK F₁ TERHADAP INFEKSI KOI HERPES VIRUS (KHV)

Khairul Syahputra[#], Yogi Himawan, dan Didik Ariyanto

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan

(Naskah diterima: 18 April 2015; Revisi final: 1 Juni 2015, Disetujui publikasi: 5 Juni 2015)

ABSTRAK

Ketahanan penyakit merupakan salah satu karakter selain pertumbuhan yang potensial dikembangkan dengan metode transgenesis pada ikan budidaya. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi transmisi transgen glikoprotein-GP11 (GP11) dari KHV dan menguji ketahanan ikan mas transgenik F₁ terhadap infeksi koi herpes virus (KHV). Empat garis keturunan F₁ transgenik (B1, B2, SA1, dan SA2) diproduksi dengan menyilangkan ikan mas jantan F₀ yang membawa gen GP11 di sperma dengan betina non-transgenik. Pengujian transmisi transgen dilakukan dengan mendeteksi transgen pada larva dan benih transgenik F₁. Deteksi transgen dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk konstruksi gen glikoprotein (krt-GP11). Evaluasi ketahanan terhadap KHV dilakukan dengan ujiantang secara kohabitasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua jantan F₀ mentransmisikan transgen pada generasi F₁. Transmisi transgen pada ikan mas transgenik F₁ berkisar antara 0%-3%. Ikan mas transgenik F₁ lebih tahan terhadap infeksi KHV dibandingkan non-transgenik. Ikan mas transgenik F₁ memiliki sintasan (85,56±7,29%) yang lebih baik dibandingkan dengan ikan mas non-transgenik (71,11±18,99%).

KATA KUNCI: ikan mas, transgenik F₁, transmisi transgen, KHV, ujiantang

ABSTRACT: *Glycoprotein transgene transmission and resistance of F₁ transgenic common carp (Cyprinus carpio) to KHV infection. By: Khairul Syahputra, Yogi Himawan, and Didik Ariyanto*

In addition to growth character, disease resistance is one of characters that potential to developed using transgenesis technology on farmed fish. The aim of this study was to evaluate the transmission of glycoprotein-11 (GP11) transgene from KHV and to evaluate the resistance of F₁ transgenic common carp to KHV infection. Four lines of F₁ transgenic were produced by crossing F₀ male common carp that were positive for the GP11 transgene in sperms with non-transgenic female. Transgene transmission was analyzed by detection of transgene in larvae and juvenile of F₁ transgenic. Detection of transgene was performed by PCR method using specific primer to glycoprotein gene construct (krt-GP11). Challenge test using cohabitation method was used to evaluate the resistance of F₁ transgenic to KHV infection. The result showed that not all of F₀ male have transmitted the transgene to F₁ generation. Transmission of transgene in transgenic F₁ was range 0% to 3%. F₁ transgenic common carp was more resistant to KHV infection than non transgenic, survival rate of F₁ transgenic (85.56±7.29%) was higher than non transgenic (71.11±18.99%).

KEYWORDS: common carp, F₁ transgenic, transgene transmission, KHV, challenge test

PENDAHULUAN

Ketahanan penyakit pada ikan budidaya merupakan salah satu karakter selain pertumbuhan yang potensial dikembangkan dengan metode transgenesis. Keberhasilan pembentukan ikan transgenik yang mempunyai ketahanan terhadap penyakit telah banyak dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Anderson *et*

al., 1996; Zhong *et al.*, 2002; Dunham *et al.*, 2002; Sarmasik *et al.*, 2002; Weifeng *et al.*, 2004; Chiou *et al.*, 2014). Keberhasilan tersebut mendorong upaya pembentukan dan penggunaan ikan transgenik tahan penyakit sebagai salah satu alternatif untuk mengatasi dan mengurangi dampak serangan penyakit pada berbagai komoditas ikan budidaya di Indonesia.

Saat ini, kegiatan pembentukan ikan transgenik tahan penyakit dilakukan di Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi pada komoditas ikan mas. Pembentukan ikan mas transgenik dilakukan dengan menyisipkan konstruksi gen glikoprotein; genimunoge-

[#] Korespondensi: Balai Penelitian Pemuliaan Ikan.
Jl. Raya Sukamandi No. 2, Subang 41256, Indonesia.
Tel.: + (0260) 520500
E-mail: khairul_syahputra@yahoo.com

nik dari koi herpes virus (KHV) untuk meningkatkan ketahanan ikan mas terhadap penyakit KHV. Infeksi KHV dapat menyebabkan kematian massal pada ikan mas (Sunarto *et al.*, 2005). Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa gen glikoprotein dapat meningkatkan ketahanan ikan mas dan koi terhadap penyakit yang disebabkan virus (Kanellos *et al.*, 2006; Emmenegger & Kurath, 2008).

Pada penelitian sebelumnya, ikan mas transgenik tahan KHV *founder* (F_0) telah berhasil diproduksi. Ikan mas transgenik F_0 memiliki performa ketahanan terhadap penyakit KHV lebih baik dibandingkan dengan non-transgenik (Syahputra *et al.*, 2014). Ikan mas transgenik F_0 jantan disilangkan dengan ikan mas betina non-transgenik untuk memproduksi ikan mas transgenik generasi F_1 . Pada penelitian ini dilakukan pengujian transmisi transgen pada ikan mas transgenik generasi F_1 dan mengevaluasi performanya terhadap penyakit KHV.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji dan Konstruksi Gen

Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan mas transgenik *founder* dan transgenik F_1 . Ikan mas transgenik merupakan ikan mas yang positif membawa konstruksi gen *pkrt-GP11*. Ikan mas transgenik dipelihara pada bak beton ukuran 25 m² dengan air mengalir, ikan diberi makan dua kali sehari secara *ad satiation* menggunakan pakan komersial dengan kandungan protein kasar 28%.

Konstruksi gen yang ditransfer pada ikan mas transgenik adalah *pkrt-GP11* (7,1 Kb) yang dibuat oleh Alimuddin (2009) (belum dipublikasi). Konstruksi gen ini dikendalikan oleh promoter keratin (*krt*) ikan sebelah Jepang (*Paralichthys olivaceus*) (Yazawa *et al.*, 2005) dengan gen target adalah glikoprotein 11 (GP11) dari virus koi herpes virus (KHV).

Pembentukan Ikan Mas Transgenik F_1

Pembentukan ikan mas transgenik generasi F_1 dilakukan dengan mengawinsilangkan ikan mas transgenik *founder* jantan dengan ikan mas non-transgenik betina. Ikan mas transgenik *founder* jantan merupakan ikan mas transgenik yang positif membawa transgen di sirip dan sperma (gonad). Sebanyak enam ekor ikan mas transgenik *founder* jantan (no. *tagging* 2072, 2073, 2074, 2075, 2098, dan 2099) dan empat ekor betina non-transgenik digunakan untuk membentuk empat garis keturunan ikan mas transgenik F_1 .

Empat garis keturunan ikan mas transgenik F_1 yang dibentuk pada penelitian ini adalah populasi B1, B2, SA1, dan SA2. Keempat populasi ikan mas trans-

genik diproduksi dengan metode pemijahan buatan dan semi-buatan, populasi B1 dan B2 dihasilkan dari pemijahan buatan menggunakan induk jantan *founder* dengan nomor *tagging* masing-masing 2072 dan 2073 sedangkan populasi SA1 dan SA2 dihasilkan dari pemijahan semi-buatan dengan perbandingan pemijahan satu betina dan dua jantan. Populasi SA1 dihasilkan dari dua induk jantan *founder* dengan nomor *tagging* 2074 dan 2075, sedangkan populasi SA2 dari dua induk jantan dengan nomor *tagging* 2098 dan 2099.

Induk jantan transgenik dan betina non-transgenik diinduksi dengan penyuntikan hormon perangsang pemijahan (ovaprim) untuk mendapatkan keseragaman kematangan sperma, telur, dan waktu ovulasi. Pada induk betina, hormon perangsang pemijahan diberikan dengan dosis 0,3 mL/kg bobot; sedangkan pada induk jantan diberikan dengan dosis 0,15 mL/kg bobot. Pemijahan buatan dilakukan dengan memfertilisasi telur dengan sperma secara buatan. Sel telur dan sperma diperoleh dengan cara *stripping* yang dilakukan 10-12 jam setelah penyuntikan.

Telur yang telah difertilisasi ditebar pada media penempelan telur berupa kakaban. Pemijahan semi-buatan dilakukan dengan menempatkan induk jantan dan betina yang telah diinjeksi dengan hormon perangsang pemijahan pada bak pemijahan yang telah berisi kakaban sebagai wadah penempelan telur saat induk ikan mas memijah. Kakaban ditempatkan di bak penetasan telur ukuran 2 m x 1 m x 0,8 m dengan kedalaman air 60 cm. Setiap bak penetasan telur dilengkapi dengan aerasi buatan dari *electric blower* dan sistem resirkulasi air. Telur akan menetas menjadi larva kurang lebih setelah tiga hari pascapijah.

Larva yang berumur 2-3 hari setelah menetas dipindahkan dari bak penetasan ke dalam bak pemeliharaan larva ukuran 2,5 m x 10 m x 1 m. Sebelum penebaran larva, bak pemeliharaan atau kolam pendederan telah disiapkan dan diberi pupuk organik untuk menumbuhkan pakan alami bagi larva yang akan ditebar. Larva dipelihara hingga ukuran benih sekitar 2-3 bulan pemeliharaan, pemberian pakan dilakukan dengan frekuensi dua kali sehari secara *ad satiation* menggunakan pakan komersial.

Deteksi Transgen *pkrt-GP11* pada Larva dan Benih Ikan Mas Transgenik F_1

Transmisi transgen dari induk ikan mas transgenik *founder* pada generasi F_1 diketahui dengan mendeteksi keberadaan transgen pada anakan F_1 . Transgen dideteksi pada DNA genom larva dan benih dari empat garis keturunan populasi ikan mas transgenik F_1 menggunakan metode PCR. Pada larva, deteksi transgen dilakukan pada 150 ekor larva yang telah berumur tiga hari setelah menetas dan diambil se-

cara acak pada setiap *line* populasi ikan mas transgenik F_1 . Ekstraksi DNA genom larva dilakukan dengan cara digabung (*pool*), setiap *pool* berisi sebanyak 30 larva. Berbeda dengan larva, deteksi transgen pada benih dilakukan secara individu menggunakan DNA genom yang diekstraksi dari jaringan sirip. Deteksi dilakukan pada 100 ekor benih ikan mas transgenik F_1 yang telah berumur tiga bulan yang diambil secara acak.

DNA genom larva dan benih diekstraksi menggunakan kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). Sebanyak 2,5 μ L (250 ng) DNA genom larva dan benih digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi PCR menggunakan kit PCR Fatstart PCR Master Mix (Roche). Primer yang digunakan untuk amplifikasi transgen krt-GP11 adalah krt-GP11 F: 5'-GCCTTCGTGGCCCTTCCCAC-3' dan krt-GP11 R: 5'-GGTTGCTCCTGTCCGCCACC-3' dengan panjang fragmen 480 bp (Syahputra & Ariyanto, 2013). Proses PCR dilakukan dengan program: 95°C selama empat menit; (95°C selama 30 detik; 64°C selama 30 detik; 72°C selama satu menit) sebanyak 40 siklus; dan 72°C selama sepuluh menit. Hasil amplifikasi PCR dicek dengan elektroforesis pada gel agarose 2% yang telah diberi pewarna DNA 0,01% (v/v) GelRed™ (Biotium) dan hasil elektroforesis diamati di bawah lampu UV transluminator dan difoto menggunakan kamera digital Canon EOS 1100D. Sebagai kontrol internal digunakan gen β -aktin ikan mas dengan panjang fragmen 300 bp, primer yang digunakan adalah F: 5'-CCC TGG CCC CCA GCA CAA TG-3' dan R: 5'-TCT GCG CAG TTG AGT CGG CG-3'.

Uji Tantang

Penyiapan Ikan Sumber KHV

Ikan yang digunakan sebagai ikan sumber virus KHV untuk uji tantang adalah benih ikan mas non-transgenik yang berukuran 10 g. Ikan sumber dibuat dengan cara menginjeksikan *filtrate homogenate* virus KHV dengan dosis 0,1 mL/ekor. Pembuatan *filtrate homogenate* KHV mengacu pada metode yang dijelaskan dalam protokol pemuliaan ikan mas (PPIIMN, 2010). Setelah diinjeksi virus KHV, ikan sumber dipelihara dalam akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm selama 21 hari dengan kepadatan satu ekor per liter air. Verifikasi ikan sumber telah terinfeksi KHV dilakukan dengan metode PCR. Analisis PCR dilakukan pada beberapa ikan sumber yang menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV selama pemeliharaan.

Ikan Uji dan Aklimatisasi

Ikan uji yang digunakan untuk uji tantang adalah benih ikan mas transgenik F_1 dan benih ikan mas non-transgenik yang berukuran 10-15 g. Ikan uji me-

rupakan ikan sehat dan terbebas dari infeksi virus KHV, pemeriksaan ikan uji bebas KHV dilakukan dengan analisis PCR. Sebelum uji tantang, ikan uji diaklimatisasi pada suhu sekitar 22°C selama 2-3 hari.

Uji Tantang

Uji tantang dilakukan secara kohabitasi dengan tiga kali ulangan pada wadah uji berupa akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm. Jumlah ikan uji yang digunakan adalah 30 ekor per akuarium. Setiap akuarium diberikan ikan sakit terinfeksi KHV sebanyak tiga dari jumlah ikan uji yang digunakan. Suhu air pemeliharaan dikondisikan pada suhu yang permisif bagi perkembangan KHV yaitu berkisar 22°C-24°C.

Uji tantang dilakukan selama 21 hari. Selama pengujian setiap akuarium diberikan aerasi yang cukup dan ikan uji diberi pakan secukupnya agar ikan uji dapat bertahan hidup. Penyiponan dan pergantian air dilakukan secukupnya secara rutin untuk membersihkan sisa pakan. Pengamatan gejala klinis terhadap ikan uji dilakukan setiap hari, dan ikan uji yang mati dikeluarkan dan kemudian dilakukan pemeriksaan KHV.

Analisis PCR Deteksi KHV

Pemeriksaan KHV pada ikan uji dilakukan menggunakan DNA genom yang diekstraksi dari organ insang. DNA genom diekstraksi menggunakan kit komersial *DNAzol Reagent Genomic DNA Isolation Reagent* (MRC). DNA genom hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan kit *PCR Hot Start Green PCR master Mix 2X* (Thermo science). Primer PCR yang digunakan untuk deteksi KHV adalah *sph1-5* dengan sekuen *forward* 5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3' dan *reverse* 5'-GACACATGTTACAATGGTTCGC-3' dengan panjang fragmen amplifikasi 290 bp. Proses PCR dilakukan dengan program: 95°C selama empat menit; (95°C selama 30 detik; 64°C selama 30 detik; 72°C selama satu menit) sebanyak 40 siklus; dan 72°C selama sepuluh menit. Hasil amplifikasi PCR dicek dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% yang telah diberi pewarna DNA 0,01% (v/v) GelRed™ (Biotium) dan hasil elektroforesis diamati di bawah lampu UV transluminator dan difoto menggunakan kamera digital Canon EOS 1100D.

HASIL DAN BAHASAN

Deteksi dan Transmisi Gen GP-11 pada Larva dan Benih F_1

Hasil analisis PCR pada larva menunjukkan bahwa tidak semua membawa transgen. Populasi B2 dan SA2 positif transgen sedangkan B1 dan SA1 negatif transgen dari 150 ekor larva yang diperiksa secara acak. Transgen yang terdeteksi pada populasi B2 dan SA2 menunjukkan persentase yang kecil, dari lima

sampel pengujian dengan masing-masing pengujian terdiri atas 30 ekor larva hanya satu sampel yang positif terdeteksi transgen untuk masing-masing populasi (Gambar 1).

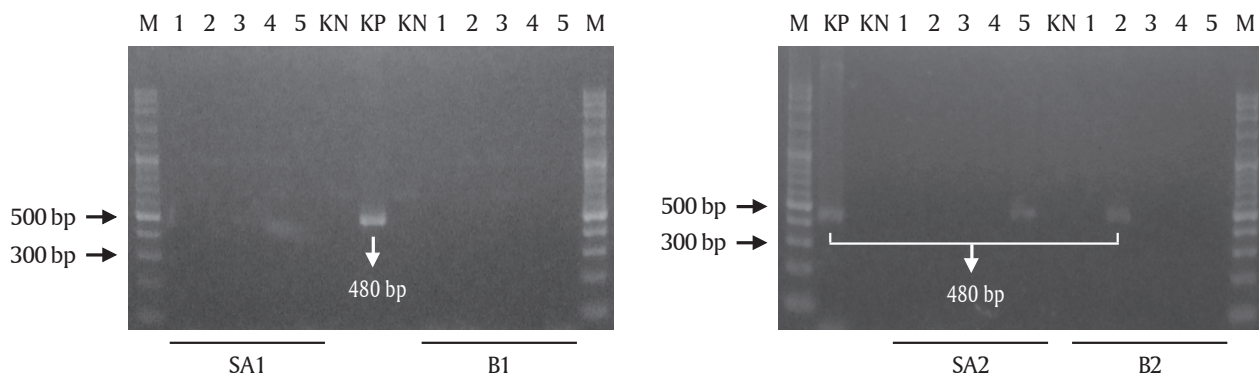
Hasil yang relatif sama juga diketahui pada level benih. Analisis PCR menunjukkan bahwa pada populasi B1 dan SA1 tidak terdeteksi individu yang membawa transgen sedangkan pada populasi B2 dan SA2 terdapat beberapa individu positif membawa transgen krt-GP11 dari 100 ekor benih yang diperiksa untuk tiap populasi. Transgen yang terdeteksi pada populasi benih B2 dan SA2 memiliki persentase yang kecil yaitu tiga ekor dari 100 ekor yang diperiksa dengan persentase 3% (3/100 ekor) (Gambar 2). Tidak terdapat perbedaan transmisi transgen pada populasi B2 dan SA2 meskipun jumlah induk *founder* yang digunakan berbeda. Populasi B2 ikan mas transgenik F_1 yang dihasilkan dari satu induk jantan *founder*, sedangkan populasi SA2 yang dihasilkan dari dua induk jantan *founder*.

Hasil deteksi transgen pada larva dan benih ikan mas transgenik F_1 menunjukkan bahwa transgen dapat diwariskan atau ditransmisikan dari *founder* pada generasi F_1 , meskipun tidak semua induk *founder* dapat menurunkan transgen pada anakan F_1 . Transmisi transgen pada ikan mas transgenik pada penelitian ini cukup rendah dibandingkan dengan penelitian transgenik pada ikan lainnya. Namun, beberapa penelitian ikan transgenik juga menunjukkan persentase transmisi transgen yang rendah seperti yang dilaporkan oleh Devlin *et al.* (1995) pada ikan transgenik coho salmon, transmisi transgen dari *founder* ke F_1 bervariasi dengan kisaran transmisi 2,2%-18,9% dan sebanyak lima ekor induk jantan *founder* tidak men-

transmisikan transgen pada keturunan F_1 . Variasi transmisi transgen pada ikan transgenik juga dilaporkan oleh Kobayashi *et al.* (2007), transmisi transgen dari induk *founder* ikan nila transgenik pada keturunan F_1 berkisar antara 5,7%-14,3%. Rendahnya transmisi transgen pada penelitian ini dapat disebabkan karena transgen terdistribusi mosaik pada sperma ikan transgenik *founder* dan kecilnya jumlah kopi transgen yang terintroduksi pada generasi *founder*. Gong *et al.* (2002) dan Hostetler *et al.* (2003) menyatakan bahwa variasi transmisi transgen dipengaruhi oleh jumlah kopi transgen yang terintroduksi pada ikan transgenik dan distribusi mosaik transgen pada sel sperma *founder*.

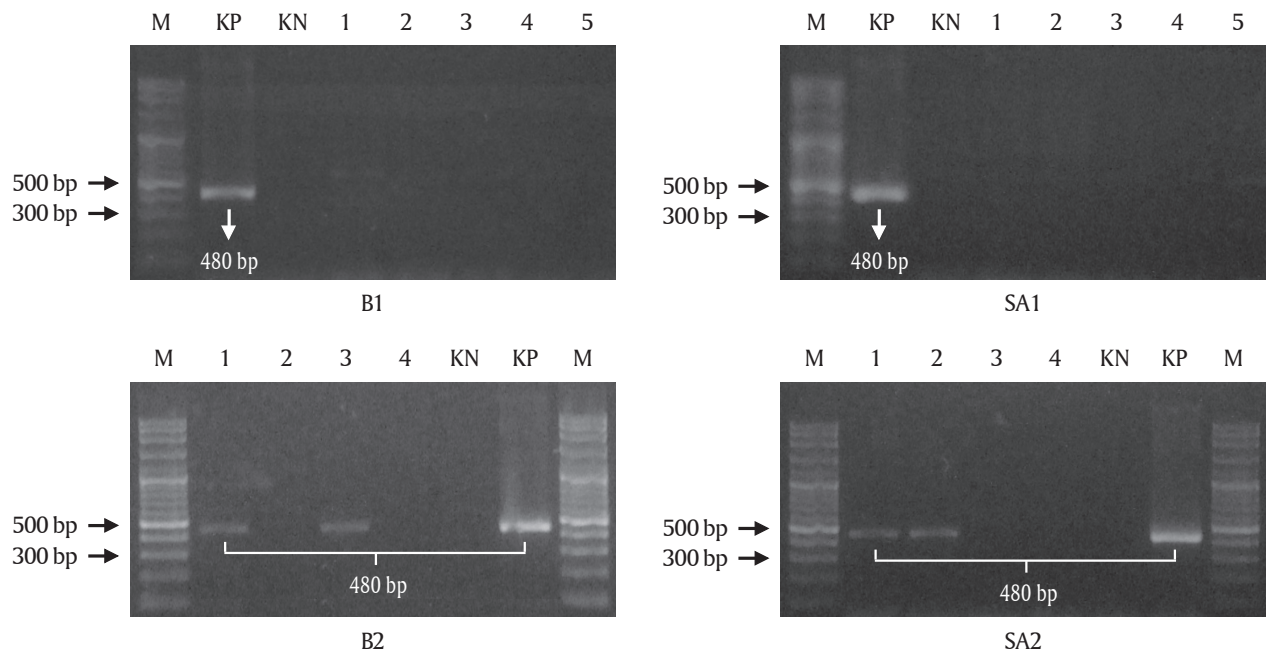
Uji Tantang

Populasi yang digunakan pada uji tantang adalah populasi B2, populasi B2 merupakan populasi ikan mas transgenik F_1 yang positif membawa transgen di larva dan benih. Berdasarkan hasil uji tantang, ikan mas transgenik F_1 memiliki ketahanan terhadap KHV lebih baik dibandingkan dengan ikan non-transgenik. Ikan mas transgenik F_1 yang ditantang dengan KHV selama 21 hari memiliki sintasan yang lebih baik (85,56%) dibandingkan dengan ikan non-transgenik (75,11%) (Gambar 3A). Hal ini menunjukkan bahwa selain transgen dapat diwariskan, performa ketahanan ikan mas transgenik terhadap KHV juga diwariskan dari *founder* ke generasi F_1 . Tidak hanya pada penelitian ini, beberapa hasil penelitian lain menyebutkan bahwa karakter ketahanan penyakit pada ikan transgenik dapat diwariskan pada generasi berikutnya. Chiou *et al.* (2014) melaporkan bahwa pada ikan transgenik rainbow trout tetap memiliki ketahanan terhadap infeksi IHNV dan *Aeromonas sp.* pada gene-



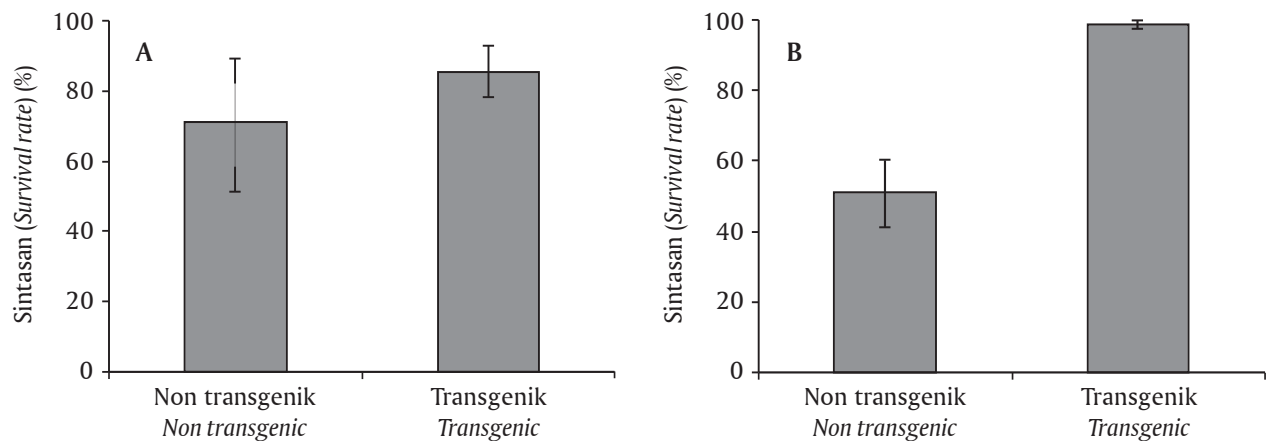
Gambar 1. Deteksi transgen krt-GP11 pada empat garis keturunan (*line*) larva transgenik F_1 . M: marker DNA; KP: kontrol positif PCR; KN: kontrol negatif PCR; 1-5: sampel larva transgenik F_1 . SA1: transgenik F_1 hasil pemijahan semi-buatan 1, B1: transgenik F_1 hasil pemijahan buatan 1, SA2: transgenik F_1 hasil pemijahan semi-buatan 2, B2: transgenik F_1 hasil pemijahan buatan 2

Figure 1. Detection of transgene krt-GP11 in four lines of F_1 transgenic larvae. M: DNA marker ladder; KP: PCR positive control; KN: PCR negative control; 1-5: F_1 transgenic larvae samples. SA1: F_1 transgenic was produced by semi-artificial spawning 1, B1: F_1 transgenic was produced by artificial spawning 1. SA2: F_1 transgenic was produced by semi-artificial spawning 2, B1: F_1 transgenic was produced by artificial spawning 2



Gambar 2. Deteksi transgen (*krt-GP11*) pada empat garis keturunan (*line*) benih transgenik F₁. M: marker DNA; KP: kontrol positif PCR; KN: kontrol negatif PCR; 1-5: sampel benih ikan mas transgenik. SA1: ikan mas transgenik F₁ hasil pemijahan semi-buatan 1, B1: ikan mas transgenik F₁ hasil pemijahan buatan 1, SA2: ikan mas transgenik F₁ hasil pemijahan semi-buatan 2, B2: ikan mas transgenik F₁ hasil pemijahan buatan 2

Figure 2. Detection of transgene (*krt-GP11*) in four lines of F₁ transgenic juvenile. M: DNA marker ladder; KP: PCR positive control; KN: PCR negative control; 1-5: F₁ transgenic seed samples. SA1: F₁ transgenic was produced by semi-artificial spawning 1, B1: F₁ transgenic was produced by artificial spawning 1. SA2: F₁ transgenic was produced by semi-artificial spawning 2, B1: F₁ transgenic was produced by artificial spawning 2



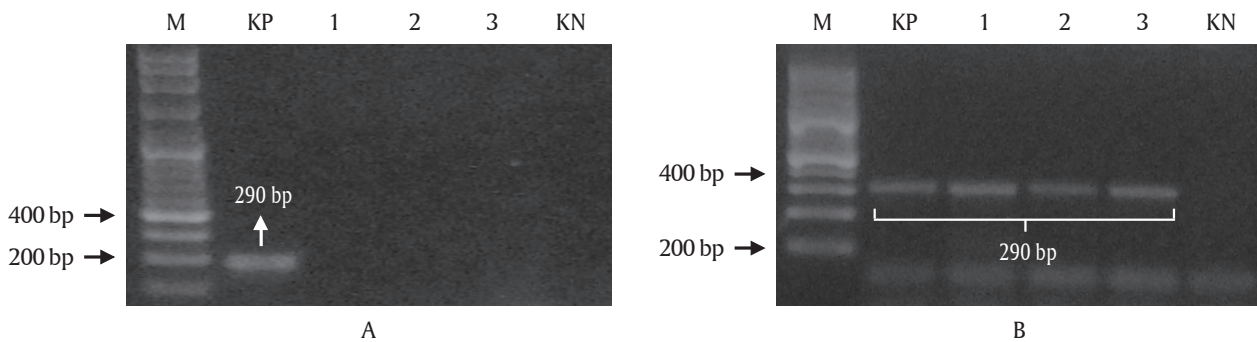
Gambar 3. Sintasan transgenik F₁ dan non-transgenik hasil uji tantang dengan KHV (A); data sintasan transgenik founder hasil uji tantang dengan KHV (B) (Syahputra *et al.*, 2014). Bar merupakan standar error, n=3

Figure 3. Survival rate of F1 transgenic and non-transgenic after KHV challenge test (A); survival rate of transgenic founder after KHV challenge test (B) (Syahputra *et al.*, 2014). Bars are standard error, n=3

rasi F₂ dan F₃ (Chiou *et al.*, 2014). Penelitian lainnya juga dilaporkan oleh Sarmasik *et al.* (2002) ikan medaka transgenik pada generasi F₂ memiliki resistensi terhadap infeksi bakteri *Pseudomonas* sp. dan *Vibrio* sp. (Sarmasik *et al.*, 2002).

Performa ketahanan KHV ikan mas transgenik F₁ sedikit lebih rendah dibandingkan dengan hasil pe-

nelitian sebelumnya pada generasi founder. Berdasarkan uji tantang dengan metode dan kondisi yang relatif sama, ikan mas transgenik founder memiliki ketahanan lebih baik terhadap KHV dengan sintasan 98,89% (Gambar 3B). Menurunnya performa ketahanan ikan mas transgenik F₁ terhadap KHV dibandingkan dengan founder dapat disebabkan oleh kecilnya jumlah atau persentase individu yang positif mem-



Gambar 4. Deteksi KHV pada transgenik F_1 (A) dan non-transgenik (B) setelah uji tantang KHV. M: marker DNA; KP: kontrol positif PCR; KN: kontrol negatif PCR; 1-3: sampel ikan uji

Figure 4. Detection of KHV in F_1 transgenic and non-transgenic after KHV challenge test. M: DNA marker ladder; KP: PCR positive control; KN: PCR negative control; 1-3: fish test samples

bawa transgen pada populasi F_1 dibandingkan dengan founder. Persentase ikan mas transgenik F_1 yang positif membawa transgen adalah 3% (Syahputra *et al.*, 2014), lebih sedikit dibandingkan dengan generasi founder yaitu 5%. Kematian ikan mas transgenik yang disebabkan oleh faktor lain selain infeksi KHV juga dapat memengaruhi nilai sintasan ikan mas transgenik, faktor lain tersebut dapat berupa faktor kualitas air selama uji tantang. Hal ini dapat dikonfirmasi dengan hasil pemeriksaan KHV pada ikan yang mati setelah uji tantang.

Berdasarkan hasil pemeriksaan KHV pada ikan uji setelah uji tantang menunjukkan bahwa ikan mas transgenik F_1 masih memiliki performa ketahanan terhadap KHV yang cukup tinggi. Kematian ikan transgenik selama uji tantang tidak disebabkan oleh infeksi KHV. Hasil analisis PCR dari tiga sampel ikan uji yang diperiksa menunjukkan bahwa semua sampel ikan mas transgenik negatif KHV (Gambar 4A). Berbeda dengan ikan mas transgenik, kematian ikan kontrol atau non-transgenik disebabkan oleh infeksi KHV yang ditularkan dari ikan sumber KHV. Hasil analisis PCR menunjukkan ketiga sampel yang diuji semuanya positif KHV (Gambar 4B).

Selain pemeriksaan KHV, parameter lain yang mendukung pada uji tantang KHV juga diamati pada penelitian ini meliputi gejala klinis dan parameter kualitas air. Berdasarkan pengamatan gejala klinis pada ikan uji selama uji tantang, ikan uji yang positif KHV dari hasil analisis PCR menunjukkan gejala klinis ikan mas terinfeksi KHV. Gejala klinis yang teramati pada ikan sakit dan mati meliputi respons ikan uji terhadap pakan berkurang, ikan lemah dan gerakan lamban, dapat bergerak sangat aktif, sering naik ke permukaan air, insang pucat memutih dengan banyak lendir, kulit memar dan melepuh. Gejala klinis yang teramati pada penelitian ini sama seperti yang dilaporkan oleh Gray *et al.* (2002), Sano *et al.* (2005), dan Sunarto *et al.* (2005).

Hasil pengamatan parameter kualitas air selama uji tantang menunjukkan bahwa kematian ikan uji selain infeksi KHV dapat juga disebabkan oleh rendahnya konsentrasi oksigen terlarut yang terdapat pada media uji tantang. Hasil pengukuran oksigen terlarut pada semua media uji adalah berkisar antara 1,2-7,2 mg/L (Tabel 1). Tauhid *et al.* (2010) menyatakan bahwa kebutuhan oksigen minimal untuk ikan mas adalah 3 mg/L. Oksigen diperlukan ikan untuk katabolisme dalam menghasilkan energi untuk aktivitas hidup. Sumber lain menyatakan bahwa oksigen terlarut yang optimal untuk pemeliharaan ikan mas adalah > 4 mg/L (BSN, 2013).

Parameter pH, amonia, dan nitrit memiliki nilai dengan kisaran yang masih optimal untuk pemeliharaan ikan mas (Tabel 1). Suhu air yang terukur selama pengujian berada pada kisaran suhu yang permisif bagi perkembangan KHV yaitu berkisar antara 21°C-23°C. Hedrick *et al.* (2000), Haenen *et al.* (2004), dan Sano *et al.* (2004) melaporkan bahwa suhu optimal perkembangan KHV yang menyebabkan kematian pada ikan mas berkisar antara 16°C-25°C. Gillad *et al.* (2003) menambahkan bahwa KHV dapat tumbuh pada kisaran suhu 15°C-25°C, suhu optimal bagi perkembangan KHV pada kisaran suhu 20°C-25°C yang menyebabkan kematian atau mortalitas pada ikan mas hingga 90%-95%.

Tabel 1. Data kualitas air selama uji tantang
Table 1. Water quality data during challenge test

Parameter (Parameters)	Kisaran Range
Suhu (Temperature) (°C)	21-23
pH	7.8-8.8
Oksigen terlarut (Dissolved oxygen) (mg/L)	1.2-7.2
Amonia total (Total ammonia) (mg/L)	0.04-0.07
Nitrit (Nitrite) (mg/L)	0.02-0.04

KESIMPULAN

Transgen krt-GP11 dapat terdeteksi pada larva dan benih ikan mas transgenik F₁ tahan KHV. Namun, tidak semua induk jantan *founder* yang digunakan pada penelitian ini dapat mentransmisikan transgen pada anakan generasi F₁, transmisi transgen pada ikan mas transgenik F₁ sebesar 3%. Ikan mas transgenik F₁ memiliki ketahanan terhadap KHV lebih baik dibandingkan dengan ikan kontrol atau non-transgenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara (APBN) melalui DIPA Tahun Anggaran 2014 Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi. Terima kasih disampaikan kepada Dr. Alimuddin (IPB Bogor) yang telah menyediakan konstruksi gen krt-GP11. Terima kasih juga disampaikan kepada semua teknisi yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Anderson, E.D., Mourich, D.V., & Leong, J.C. (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5, 114-22.
- Badan Standarisasi Nasional [BSN]. (2013). SNI 7875. Pembesaran ikan mas (*Cyprinus carpio*, L) di kolam air tenang. 10 hlm.
- Chiou, P.P., Chen, M.J., Lin, C.-M., Khoo, J., Larson, J., Holt, R., Leong, Jo-Ann, Thorgarrd, G., & Chen, T.T. (2014). Production of homozygous transgenic rainbow trout with enhanced disease resistance. *Mar. Biotechnol.*, 16, 299-308.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., & Choy-Leong, H. (1995). Transmission and phenotypic effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 137, 161-169.
- Dunham, R.A., Warr, G., Nichols, A., Duncan, P.L., Argue, B., & Middleton, D. (2002). Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish, *Ictalurus punctatus*, possessing cecropin genes. *Mar. Biotechnol.*, 4, 338-44.
- Emmenegger, E.J., & Kurath, G. (2008). DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 26, 6415-6421.
- Gillad, O., Susan, Y., Mark, A., Adkison, Keith, W., Neil, H., Willits, B., & Herve, R.P. (2003). Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*, 84, 2661-2668.
- Gong, Z., Ju, B., Wang, X., He, J., Wan, H., Sudha, P.M., & Yan, T. (2002). Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from *keratin8*. *Developmental Dynamics*, 223, 204-215.
- Gray, W.L., Mullis, L., LaPatra, S.E., Groff, J.M., & Goodwin, A. (2002). Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.*, 25, 171-178.
- Haenen, O.L.M., Way, K., Bergmann, S.M., & Ariel, E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 24, 293-307.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., Marty, G.D., Nordhausen, R.W., Kebus, M.J., Bercovier, H., & Eldar, A. (2000). A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health*, 12, 44-57.
- Hostetler, H.A., Peck, S.L., & Muir, W.M. (2003). High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radion frequency pulses. *Transgenic Research*, 12, 413-424.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., D'Mello, F., Horward, C.R., Mackie, A., Dixon, P.F., Chang, K.C., Ramstad, A., Midlyng, P.J., & Russel, P.H. (2006). DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 24, 4927-4933.
- Kobayashi, Snin-ichiro, Alimuddin, Morita, T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. (2007). Transgenic nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270, 427-435.
- Pusat Pengembangan Induk Ikan Mas Nasional [PPIIMN]. (2010). Protokol Pemuliaan Ikan Mas. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar Sukabumi. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Kementerian Kelautan dan Perikanan. 39 hlm.
- Sarmasik, A., Warr, G., & Chen, T.T. (2002). Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.*, 4, 310-322.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Yanai, T., Watanabe, N., Miwa, S., & Iida, T. (2004). First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, 39, 165-167.
- Sano, M., Ito, T., Kurita, J., Miwa, S., & Iida, T. (2005). Diagnosis of koi herpesvirus (KHV) disease in Japan. *Bull. Fish. Res. Agen. Supplement*, 2, 59-64.

- Sunarto, A., Taukhid, Rukyani, A., Koesharyani, I., Supriyadi, H., Gardenia, L., Huminto, H., Agungpriyono, D.R., Pasaribu, F.H., Herdikiawan, D., Rukmono, D., & Prayitno, B. (2005). Field investigations on a serious disease outbreak among Koi and common carp (*Cyprinus carpio*) in Indonesia. In Walker, P., Lester, R., & Bondad-Reantaso, M.G. (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture V*, p. 125-135. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Syahputra, K., & Ariyanto, D. (2013). Primer spesifik PCR untuk deteksi dan skrining ikan mas transgenik tahan KHV. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan X Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan. (Jilid 1) Budidaya Perikanan*. Kode: PL06.
- Syahputra, K., Himawan, Y., & Ariyanto, D. (2014). Ketahanan ikan mas (*Cyprinus carpio*) transgenik yang membawa gen glikoprotein terhadap koi herpesvirus (KHV). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. Bandung, hlm. 1075-1081.
- Taukhid, Lusiastuti, A.M., Andiyani, W., Rosidah, & Sriati. (2010). Induksi kekebalan spesifik pada ikan mas, *Cyprinus carpio* Linn. Terhadap infeksi koi herpesvirus (KHV) melalui teknik kohabitasi terkontrol. *J. Ris. Akuakultur*, 5(2), 257-276.
- Weifeng, M., Yaping, W., Wenbo, W., Bo, W., Jianxin, F., & Zuoyan, Z. (2004). Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 242, 93-103.
- Yazawa, R., Hiruno, I., & Aoki, T. (2005). Characterization of promoter activities of four different Japanese flounder promoters in transgenic zebrafish. *Marine Biotechnology*, 7, 625-633.
- Zhong, J., Wang, Y., & Zhu, Z. (2002). Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. *Aquaculture*, 214, 93-101.