

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

TRANSMISI GEN krt-GP11 DAN PERFORMA KETAHANAN IKAN MAS (*Cyprinus carpio*) TRANSGENIK F-2 TERHADAP INFEKSI KHV

Khairul Syahputra[#], Flandrianto Sih Palimirmo, dan Yogi Himawan

Balai Penelitian Pemuliaan Ikan

ABSTRAK

Pembentukan ikan mas transgenik merupakan salah satu program penelitian di Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi dalam rangka menghasilkan varietas unggul ikan mas tahan infeksi KHV (*Koi herpesvirus*). Pada tahun 2015 telah dilakukan pembentukan ikan mas transgenik tahan KHV generasi F-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi transmisi gen krt-GP11, ketahanan ikan mas transgenik F-2 terhadap infeksi KHV, keberadaan marka Cyca-DAB1*05 tahan KHV pada populasi ikan mas transgenik F-2. Ikan mas transgenik F-2 dihasilkan dengan memijahkan ikan mas transgenik F-1 jantan dengan betina non-transgenik. Pengujian transmisi transgen dan deteksi marka ketahanan KHV pada transgenik F-2 dilakukan dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk transgen krt-GP11 dan gen Cyca-DAB1*05. Evaluasi ketahanan ikan mas transgenik F-2 terhadap infeksi KHV dilakukan dengan ujiantang secara kohabitasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transmisi gen krt-GP11 pada keturunan F-2 memiliki persentase yang relatif rendah yaitu sebesar 0%-2%. Ikan mas transgenik F-2 memiliki ketahanan relatif baik terhadap KHV dengan sintasan ujiantang sebesar 90% dan tidak berbeda nyata dengan ikan mas pembandingan atau non-transgenik ($P > 0,05$). Tingginya persentase keberadaan marka Cyca-DAB1*05 pada populasi transgenik berperan pada ketahanan ikan mas transgenik terhadap infeksi KHV.

KATA KUNCI: ikan mas; KHV; transgenik; ujiantang; transmisi gen krt-GP11

ABSTRACT: *Transmission of krt-GP11 gene and resistance performance of F-2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) against to KHV infection. By: Khairul Syahputra, Flandrianto Sih Palimirmo, and Yogi Himawan*

*Creating of transgenic common carp is one of the breeding programs in Research Institute for Fish Breeding for producing a superior strain of common carp resistant to KHV (*Koi herpesvirus*). Since 2015, the creation of common carp transgenic has been conducted to produce F₂ population resistant to KHV. This study was aimed to evaluate the transmission of krt-GP11 gene, the resistance of F₂ transgenic common carp against to KHV infection, and the existence of Cyca-DAB1*05 marker resistant to KHV in F₂ transgenic population. F₂ transgenic population has been produced by mating F₁ transgenic male with non transgenic female. Transgene transmission and the existence of marker resistant to KHV in F₂ transgenic population were evaluated by PCR method using specific primer to krt-GP11 gene and Cyca-DAB1*05 gene, respectively. The resistance of F₂ transgenic population against to KHV infection was evaluated by challenge test using cohabitation method. The result showed that transmission of krt-GP11 gene in F₂ transgenic population was relatively low with percentage of 0-2%. The resistance of F₂ transgenic common carp against to KHV was relatively high with survival rate of 90% and was not significantly different from non transgenic ($P > 0.05$). High percentage of transgenic population having Cyca-DAB1*05 marker had a role in resistance of transgenic population against KHV infection.*

KEYWORDS: common carp; KHV; transgenic; challenge test; transgene transmission

PENDAHULUAN

Teknologi transgenik potensial digunakan untuk meningkatkan ketahanan penyakit pada ikan

khususnya pada ikan budidaya yang bernilai ekonomis tinggi (Zhong *et al.*, 2002; Dunham, 2009). Pemanfaatan teknologi ini telah diawali oleh Anderson *et al.* (1996) dengan mentransfer gen penyandi antisense viral (*viral coat protein gene*) yang dapat meningkatkan ketahanan ikan rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) terhadap virus. Peningkatan ketahanan penyakit dengan transgenesis juga telah dilakukan untuk

[#] Korespondensi: Balai Penelitian Pemuliaan Ikan. Jl. Raya 2 Pantura Sukamandi, Subang 41263, Jawa Barat, Indonesia. Tel. + (0260) 520500 E-mail: khairul_syahputra@yahoo.com

penyakit lainnya seperti introduksi gen laktoferin pada ikan *grass carp* (*Ctenopharyngodon idellus*) yang dapat meningkatkan ketahanan terhadap virus GCH (*Grass Carp Haemorrhage*) (Zhong *et al.*, 2002), sedangkan pada udang telah dilakukan oleh Lu & Sun (2005) dengan mentransfer gen antisense *Taura syndrome virus-coat protein* dapat meningkatkan ketahanan terhadap virus *Taura*. Tidak hanya ketahanan terhadap virus, ketahanan penyakit yang disebabkan bakteri juga telah dilaporkan, seperti pada ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Dunham *et al.*, 2002), ikan medaka (Sarmasik *et al.*, 2002), dan ikan grass carp (Weifeng *et al.*, 2004). Ketahanan terhadap bakteri dan virus juga telah dilaporkan oleh Chiou *et al.* (2014) pada ikan rainbow trout.

Pendekatan transgenesis perlu dilakukan untuk menghasilkan ikan mas tahan penyakit khususnya *Koi Herpesvirus* (KHV). KHV merupakan virus yang menyerang dan menyebabkan kematian massal pada ikan mas, penyakit KHV menyebabkan penurunan produktivitas nasional ikan mas sejak tahun 2002 (Sunarto *et al.*, 2005). Pembentukan ikan mas tahan KHV dapat dilakukan dengan mentransfer gen imunogenik (glikoprotein) tahan KHV. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa gen glikoprotein dapat meningkatkan ketahanan ikan terhadap virus seperti pada ikan rainbow trout (LaPatra *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000), ikan mas (Kanellos *et al.*, 2006), dan ikan koi (Emmenegger & Kurath, 2008).

Pembentukan ikan mas transgenik tahan KHV telah diawali dengan pembentukan ikan mas transgenik *founder* dengan mengintroduksi gen glikoprotein tahan KHV (krt-GP11) menggunakan metode elektroporasi sperma. Pada tahun 2013 telah diperoleh calon induk *founder* jantan yang positif membawa transgen di sperma, dan pada tahun 2014 telah diperoleh ikan mas transgenik F-1 jantan yang positif membawa transgen di sperma. Berdasarkan hasil uji tantang, ikan mas transgenik F-1 memiliki daya tahan terhadap KHV yang lebih baik dibandingkan ikan non-transgenik dengan peningkatan sintasan sebesar 20,32% (Syahputra *et al.*, 2014). Pada tahun 2015, kegiatan penelitian lanjutan yang dilakukan adalah pembentukan ikan mas transgenik F-2 tahan KHV. Pembentukan ikan mas transgenik F-2 dilakukan dengan mengawinkan ikan mas jantan transgenik F-1 dengan ikan mas betina non-transgenik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi transmisi gen krt-GP11 pada ikan mas transgenik generasi F-2 dan mengevaluasi performa ketahanannya terhadap KHV. Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan evaluasi keberadaan marka molekuler Cyca-DAB1*05 terkait ketahanan KHV pada populasi ikan

mas transgenik F-2. Keberadaan marka tersebut dapat memengaruhi ketahanan ikan mas transgenik F-2 terhadap infeksi KHV selain gen krt-GP11 yang telah diintroduksi. Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa marka Cyca-DAB1*05 berkorelasi terhadap ketahanan ikan mas terhadap infeksi KHV seperti yang dilaporkan oleh Rakus *et al.* (2009) dan Alimuddin *et al.* (2011), dan bahkan marka ini telah berhasil dan efektif digunakan pada kegiatan pemuliaan ikan mas tahan KHV di Indonesia (Ariyanto *et al.*, 2015; Sucipto *et al.*, 2014).

BAHAN DAN METODE

Pembentukan Populasi F-2 Transgenik

Sebanyak lima ekor induk jantan F-1 transgenik yang membawa gen krt-GP11 pada gamet dipijahkan dengan induk betina yang non-transgenik untuk mendapatkan keturunan F-2. Induk yang telah matang gonad dipijahkan dan ditempatkan ke dalam bak pemijahan. Pemijahan dilakukan dengan metode semi-buatan dan buatan yang disesuaikan dengan kondisi kesiapan induk saat pemijahan. Induk diinduksi dengan penyuntikan ovaprim untuk mendapatkan keseragaman kematangan sperma, telur, dan ovulasi. Pada induk betina ovaprim diberikan dengan dosis 0,3 mL/kg bobot, sedangkan pada induk jantan dilakukan penyuntikan ovaprim dengan dosis 0,15 mL/kg bobot. Pada pemijahan buatan, sel telur, dan sperma diperoleh dari induk yang telah diinjeksi ovaprim dengan cara *striping* yang dilakukan 10-12 jam setelah penyuntikan. Larva dan benih yang dihasilkan dipelihara sesuai dengan SOP pemeliharaan larva dan benih ikan mas. Larva dipelihara pada bak pendederan tahap-1 ukuran 25 m² dengan kepadatan 800 ekor/m². Selama pemeliharaan, larva memanfaatkan pakan alami yang terdapat pada bak pemeliharaan yang telah disiapkan sebelumnya. Setelah dua minggu dalam tahap pemeliharaan pendederan-1, benih dipindahkan ke bak pendederan tahap-2 dengan kepadatan 50 ekor/m². Selama tahap pendederan-2 benih diberi pakan buatan dengan kandungan protein 40% sampai umur 2-3 bulan.

Transmisi Transgen

Transmisi transgen pada keturunan F-2 dilakukan dengan analisis PCR menggunakan DNA genom dari larva dan benih ikan mas transgenik yang telah berumur 2-3 bulan. Pada larva, deteksi transgen dilakukan pada 150 ekor larva yang telah berumur tiga hari setelah menetas dan diambil secara acak pada setiap populasi F-2. 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-2 yang telah berumur 2-3 bulan yang diambil secara acak. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan menggunakan kit komersial *GeneJET DNA Purification Kit* (Thermo Scientific, Lithuania), dengan prosedur mengikuti protokol yang terdapat pada manual kit. DNA hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C hingga dilakukan proses amplifikasi PCR. Kemurnian dan kuantitas DNA diukur menggunakan alat GeneQuant™1300.

Analisis PCR untuk deteksi transgen dilakukan menggunakan kit FastStart PCR Master (Roche, Jerman) dan primer spesifik untuk gen krt-GP11 yaitu *forward*: 5'-GCCTTCGTGGCCCTTCCCAC-3' dan *reverse*: 5'-GGTTGCTCCTGTCCGCCACC-3' dengan panjang fragmen amplifikasi 480 bp. Komposisi bahan yang digunakan untuk amplifikasi PCR adalah 12,5 μL *Master Mix* PCR; 0,375 μL untuk tiap primer (20 μM); 2,5 μL DNA genom dan ditambahkan *water PCR-grade* hingga total volume 25 μL . Program PCR yang digunakan meliputi: 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 tujuh menit. Hasil amplifikasi PCR diseparasi dengan elektroforesis pada gel agarose 2% yang telah diberi pewarna GelRed™ (Biotium) dan hasil elektroforesis diamati pada UV transiluminator dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Canon EOS 1100D.

Deteksi Marka Cyca-DAB1*05 pada Populasi Ikan Mas Transgenik F-2

Pengujian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh keberadaan marka Cyca-DAB1*05 terhadap ketahanan ikan mas transgenik F-2 pada infeksi KHV selain peran transgen krt-GP11 yang telah diintroduksi. Deteksi marka Cyca-DAB1*05 dilakukan pada 50 ekor ikan mas transgenik F-2 dengan metode PCR menggunakan primer spesifik untuk alel Cyca-DAB1*05 (Alimuddin *et al.*, 2011) yaitu *forward*: CTAATGGATACTACTGG dan *reverse*: ATCGCTGACTGTCTGTT dengan ukuran produk amplifikasi sebesar 300 bp. Marka Cyca-DAB1*05 dideteksi pada DNA genom yang diekstraksi dari jaringan sirip menggunakan kit komersial *GeneJET DNA Purification Kit* (Thermo Scientific, Lithuania), dengan prosedur mengikuti protokol yang terdapat pada manual kit. Program PCR amplifikasi Cyca-DAB1*05 meliputi: 95°C selama tiga menit; (95°C selama 30 detik; 50°C selama 30 detik; 72°C selama satu menit) sebanyak 30 siklus; dan 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi PCR marka Cyca-DAB1*05 divisualisasi dengan prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya.

Uji Tantang Ikan Mas Transgenik F-2

Ujiantang dilakukan dengan metode kohabitasi yang mengacu pada protokol nomor-3 tentang ujiantang ikan mas terhadap KHV (Pusat Pengembangan Ikan Mas Nasional, PPIMN 2012). Ikan uji yang digunakan adalah benih ikan mas transgenik F-2 yang diambil secara acak pada populasi $F_2B\#2$. Populasi $F_2B\#2$ merupakan populasi terindikasi positif membawa gen krt-GP11 di benih. Sebagai pembandingan digunakan ikan mas Rajadanu hasil seleksi tahan KHV yang merupakan koleksi BPPI, Sukamandi dan ikan mas Majalaya tahan KHV (Mantap) yang diperoleh dari BBPAT, Sukabumi. Pengujian dilakukan dengan menambahkan sebanyak tiga ekor ikan sumber infeksi KHV pada tiap pengujian. Ikan sumber infeksi KHV dibuat dengan cara menginjektikan *filtrate homogenate* virus KHV dengan dosis 0,1 mL/ekor. Setelah diinjeksi virus KHV, ikan sumber dipelihara dalam akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm dengan kepadatan satu ekor per liter air hingga menunjukkan gejala klinis terinfeksi KHV. 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.

Ujiantang dilakukan pada wadah uji berupa akuarium berukuran 60 cm x 40 cm x 40 cm. Jumlah ikan uji yang digunakan sebanyak 30 ekor per akuarium dengan kepadatan satu ekor per liter air. Setiap perlakuan ujiantang dilakukan dengan tiga kali ulangan. Suhu air pemeliharaan dikondisikan pada suhu yang permisif bagi perkembangan KHV yaitu berkisar 22°C - 24°C . Ujiantang dilakukan selama 14 hari, setiap akuarium pengujian diberikan aerasi yang cukup selama pengujian. Ikan uji diberi pakan dua kali sehari menggunakan pakan komersial (protein 28%). Pakan diberikan secukupnya agar ikan uji tetap bertahan hidup. Penyifonan dan pergantian air (sebanyak 50% volume air pengujian) dilakukan setiap dua hari sekali untuk membersihkan sisa pakan. Pengamatan gejala klinis dan mortalitas ikan uji dilakukan setiap hari selama pengujian. Ikan yang mati selama pengujian dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan KHV menggunakan metode PCR.

Pemeriksaan KHV dengan Metode PCR

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, USA) sesuai prosedur yang terdapat pada manual kit. DNA genom hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan kit PCR *Hot Start Green PCR master Mix*

2X (Thermo Scientific, Lithuania). Primer PCR yang digunakan untuk pemeriksaan KHV adalah *sphI*-5 dengan sekuen *forward* 5'-GAC ACC ACA TCT GCA AGG AG-3' dan *reverse* 5'-GAC ACA TGT TAC AAT GGT CGC-3' dengan panjang fragmen amplifikasi 290 bp. Komposisi bahan yang digunakan untuk amplifikasi PCR adalah 12,5 μ L *Maxima Hot Start Green PCR Master Mix* (2X); 0,5 μ L untuk tiap primer (20 μ M); 2 μ L DNA genom dan ditambahkan *water nuclease-free* hingga total volume 25 μ L. Proses PCR dilakukan dengan program: 95°C selama empat menit; (95°C selama 30 detik; 55°C selama 30 detik; 72°C selama satu menit) sebanyak 40 siklus; dan 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi PCR dicek dengan prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya.

Analisa Data

Data transmisi gen krt-GP11 dan pemeriksaan marka *Cyca-DAB1*05* pada populasi transgenik F-2, serta data hasil deteksi KHV pada ujiantang dianalisis secara deskriptif. Analisis statistik dilakukan pada data sintasan ujiantang menggunakan uji *one way Anova* dengan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN BAHASAN

Populasi Ikan Mas Transgenik F-2

Sebanyak lima populasi ikan mas transgenik F-2 heterozigot telah dibentuk pada penelitian ini yaitu populasi F₂SA#1, F₂SA#2, F₂SA#3, F₂B#1, dan F₂B#2. Populasi F₂SA#1, F₂SA#2, dan F₂SA#3 dihasilkan dari pemijahan semi-buatan sedangkan F₂B#1 dan F₂B#2 dihasilkan dari pemijahan buatan.

Deteksi dan Transmisi Gen krt-GP11 Pada Larva dan Benih Populasi F-2 Transgenik

Hasil analisis PCR deteksi transgen krt-GP11 pada larva menunjukkan bahwa hanya satu populasi yang positif membawa transgen di larva dari lima populasi yang dihasilkan, yaitu populasi F₂SA#1. Transgen yang terdeteksi pada populasi F₂SA#1 menunjukkan persentase yang kecil, dari lima sampel pengujian dengan masing-masing sampel terdiri atas 30 ekor larva hanya satu sampel yang positif terdeteksi transgen untuk masing-masing populasi (Gambar 1).

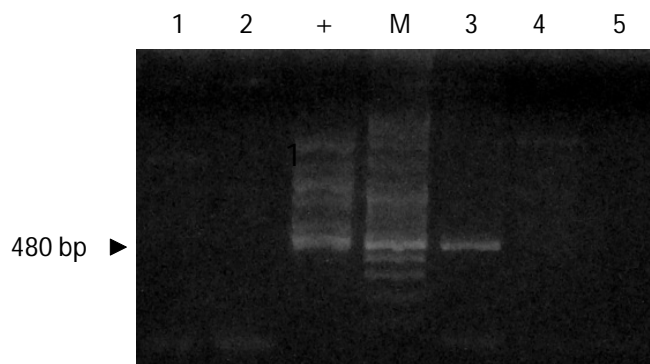
Hasil yang relatif berbeda terdeteksi pada level benih, berdasarkan analisis PCR menunjukkan bahwa pada populasi F₂B#2 yang negatif transgen di larva namun terdeteksi pada level benih. Hal ini disebabkan karena transmisi transgen yang relatif rendah, sehingga individu transgenik yang terdistribusi pada populasi transgenik memiliki persentase yang kecil. Selain itu, pengambilan sampel yang dilakukan secara acak memungkinkan transgenik hanya terdeteksi pada

benih bukan pada larva dan juga sebaliknya dapat terdeteksi hanya pada larva tapi tidak terdeteksi di benih karena individu yang diperiksa dalam populasi berbeda. Sementara itu, hasil yang konsisten ditunjukkan pada populasi F₂B#1, F₂SA#2, dan F₂SA#3, pada populasi ini transgen tidak terdeteksi baik pada tahap larva maupun benih. Sampel benih yang diperiksa untuk tiap populasi adalah sebanyak 100 ekor. Transgen yang terdeteksi pada populasi benih F₂B#2 memiliki persentase yang kecil yaitu dari 100 ekor yang diperiksa hanya dua ekor yang positif transgen (Gambar 2).

Hasil deteksi transgen pada larva dan benih ikan mas transgenik F-2 menunjukkan bahwa transgen dapat diwariskan atau ditransmisikan dari F-1 pada generasi F-2, meskipun tidak semua induk F-1 dapat menurunkan transgen pada F-2. Transmisi transgen dari F-1 ke F-2 lebih rendah dibandingkan dengan generasi sebelumnya yaitu dari *founder* ke F-1. Transmisi transgen pada penelitian ini hanya 2%, sedangkan dari *founder* ke F-1 sebesar 3% (Syahputra *et al.*, 2014). Transmisi transgen pada penelitian juga berbeda dengan transmisi transgen pada ikan mas transgenik yang dilaporkan oleh Zhong *et al.* (2012) ikan mas transgenik yang ditransfer gen hormon pertumbuhan menggunakan metode mikroinjeksi memiliki transmisi transgen yang mengikuti pola pewarisan Mendel.

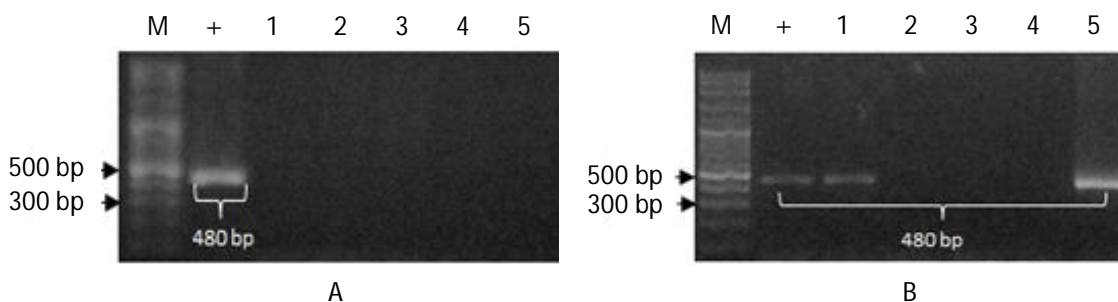
Transmisi transgen pada ikan mas transgenik pada penelitian ini juga cukup rendah dibandingkan dengan penelitian transgenik pada ikan lainnya. Pada ikan transgenik coho salmon, transmisi transgen dari *founder* ke F-1 bervariasi dengan kisaran transmisi 2,2%-18,9% (Devlin *et al.*, 1995). Devlin *et al.* (1995) juga melaporkan bahwa sebanyak lima ekor induk jantan *founder* tidak mentransmisikan transgen pada keturunan F-1. Variasi transmisi transgen pada ikan transgenik juga dilaporkan oleh Kobayashi *et al.* (2007), transmisi transgen dari induk F-1 ikan nila transgenik pada keturunan F-2 berkisar antara 55%-60%.

Rendahnya transmisi transgen pada ikan mas transgenik F-2 kemungkinan disebabkan karena transgen yang terintroduksi pada induk transgenik F-1 memiliki jumlah kopi yang sedikit, terdistribusi mosaik pada jaringan termasuk sel gonad, dan tidak terintegrasi pada genom. Maclean (1998) menyatakan bahwa transgen akan sulit atau tidak mungkin ditransmisikan pada generasi berikutnya jika sel-sel germinal ikan transgenik hanya membawa sedikit dan atau bahkan tidak membawa transgen. Ikan transgenik yang tidak mentransmisikan transgen pada keturunannya mengindikasikan bahwa transgen tidak terintegrasi pada sel-sel germinal. Secara teori, jika semua sel-sel germinal ikan transgenik membawa



Gambar 1. Deteksi transgen (*krt-GP11*) pada lima populasi larva ikan mas transgenik F₂; M= marker DNA; (+)= kontrol positif plasmid; 1= F₂B#1; 2= F₂B#2; 3= F₂SA#1; 4= F₂SA#2; dan 5= F₂SA#1

Figure 1. Detection of transgene (*krt-GP11*) in five larvae of populations F₂ transgenic common carp; M= DNA marker; (+)= positive control of plasmid; 1= F₂B#1; 2= F₂B#2; 3= F₂SA#1; 4= F₂SA#2; and 5= F₂SA#1



Gambar 2. Deteksi transgen (*krt-GP11*) pada benih ikan mas transgenik F-2; A) populasi F₂B#1 dan B) populasi F₂B#2; M= marker DNA; (+)= kontrol positif plasmid; 1-5= sampel benih ikan mas transgenik F-2

Figure 2. Detection of transgene (*krt-GP11*) of juvenile F-2 transgenic common carp; A) F₂B#1 population and B) F₂B#2 population; M= DNA marker; (+)= positive control of plasmid; 1-5= juvenile samples of F-2 transgenic common carp

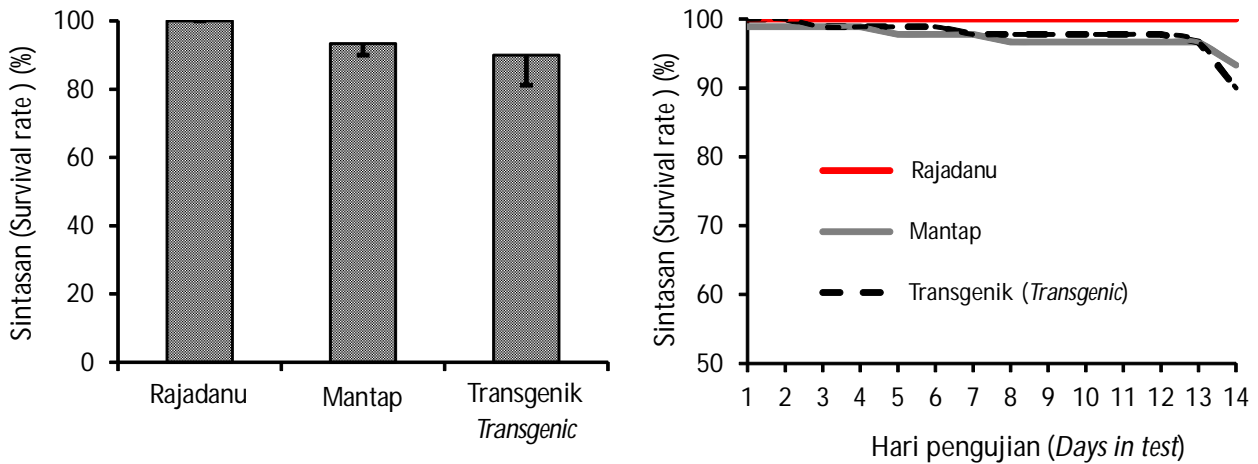
transgen (tidak terdistribusi mosaik) dan ikan tersebut dikawinkan dengan non-transgenik akan menghasilkan 50% anakan transgenik (Figueiredo *et al.*, 2007). Maclean (1998) menambahkan bahwa identifikasi ikan transgenik akan sulit dilakukan pada populasi dengan persentase transgenik yang relatif kecil dan terdistribusi mosaik, kecuali pada populasi tersebut menggunakan penanda yang mudah dideteksi seperti *gene reporter*.

Uji Tantang

Berdasarkan hasil uji tantang, ikan mas transgenik F-2 memiliki ketahanan terhadap KHV yang relatif tinggi meskipun tidak lebih baik dibandingkan dengan ikan pembanding atau non-transgenik. Secara statistik, tingkat ketahanan ikan mas transgenik F-2 terhadap KHV tidak berbeda signifikan dengan ikan pembanding

($P > 0,05$). Ikan pembanding merupakan ikan mas Rajadanu dan Majalaya yang membawa marka Cyca-DAB1*05 terkait ketahanan terhadap infeksi KHV (Ariyanto *et al.*, 2015). Ikan mas transgenik F-2 yang ditantang dengan KHV selama 14 hari memiliki sintasan 90%. Performa ketahanan KHV ikan mas transgenik F-2 lebih baik dibandingkan dengan F₁ dan sedikit lebih rendah dibandingkan dengan generasi *founder*. Berdasarkan uji tantang dengan metode dan kondisi yang relatif sama, ikan mas transgenik F-1 memiliki sintasan sebesar 85,56% dan *founder* memiliki sintasan sebesar 98,89% (Gambar 3).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa selain transgen dapat diwariskan, performa ketahanan ikan mas transgenik terhadap KHV juga diwariskan dari F-1 ke generasi F-2. Beberapa hasil penelitian lain menyebutkan bahwa karakter ketahanan penyakit pada



Gambar 3. Sintasan (A) dan sintasan harian kumulatif (B) ikan uji hasil ujiantang dengan KHV. Sintasan ikan uji tidak berbeda secara signifikan ($P > 0,05$) (Bar merupakan standar deviasi ($n = 3$))

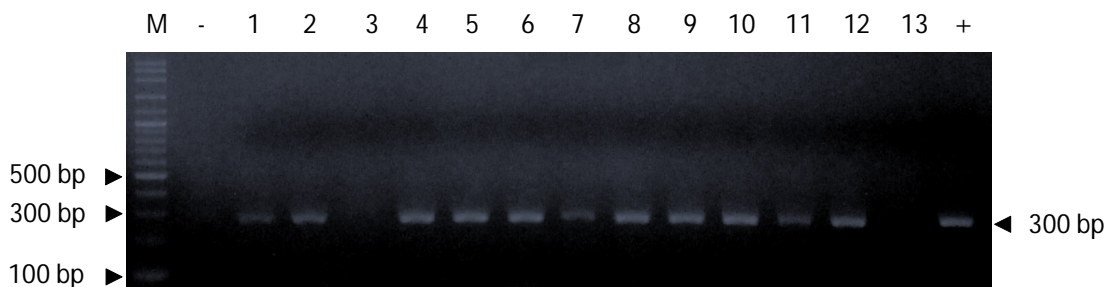
Figure 3. Survival rate (A) and cumulative daily survival rate (B) of test fish after KHV challenge test. Survival rates of test fish were not significantly different ($P > 0.05$) (Bars are standard deviation ($n = 3$))

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 generasi F-2 dan F-3 (Chiou *et al.*, 2014). Penelitian lainnya juga dilaporkan oleh Sarmasik *et al.* (2002), ikan medaka transgenik pada generasi F-2 memiliki resistensi terhadap infeksi bakteri *Pseudomonas* dan *Vibrio*.

Selain transgen krt-GP11, keberadaan marka Cyca-DAB1*05 juga berperan pada ketahanan ikan mas transgenik F-2 terhadap infeksi KHV selama ujiantang. Hasil uji PCR menunjukkan bahwa 92% (46/50) dari populasi ikan mas transgenik F-2 positif membawa marka Cyca-DAB1*05 (Gambar 4). Rakus *et al.* (2009) dan Alimuddin *et al.* (2011) menyatakan bahwa marka Cyca-DAB1*05 merupakan marka

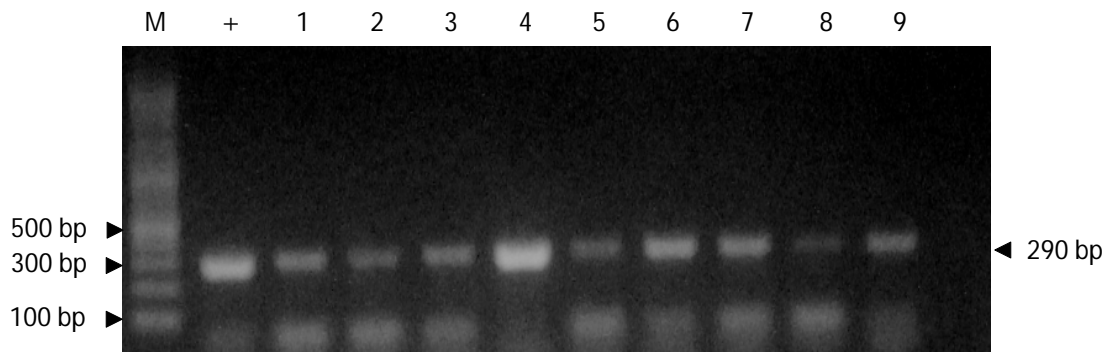
molekuler ketahanan terhadap penyakit KHV pada ikan mas. Persentase keberadaan marka Cyca-DAB1*05 yang tinggi pada populasi ikan mas berkorelasi dengan ketahanan terhadap infeksi KHV. Sucipto *et al.* (2014) melaporkan bahwa 83,33% populasi ikan mas Majalaya tahan KHV (MANTAP) membawa marka Cyca-DAB1*05 dan memiliki sintasan ujiantang yang tinggi yaitu 100%. Ariyanto *et al.* (2015) menambahkan, populasi ikan mas Rajadanu tahan infeksi KHV yang 100% membawa marka tersebut memiliki sintasan ujiantang sebesar 95%.

Berdasarkan hasil pemeriksaan KHV pada ikan uji yang mati setelah ujiantang menunjukkan bahwa kematian ikan uji selama ujiantang disebabkan oleh infeksi KHV. Semua ikan uji positif terinfeksi KHV berdasarkan analisis PCR (Gambar 5). Hasil pengujian ini juga menunjukkan bahwa ikan uji yang mampu



Gambar 4. Deteksi marka Cyca-DAB1*05 pada ikan mas transgenik F-2; M= marker DNA; (+)= kontrol positif marka Cyca-DAB1*05; (-)= kontrol negatif; 1-13= sampel ikan mas transgenik F-2

Figure 4. Detection of Cyca-DAB1*05 marker in F-2 transgenic common carp; M= DNA marker; (+)= positive control of Cyca-DAB1*05 marker; (-)= negative control; 1-13= sample of F-2 transgenic common carp



Gambar 5. Deteksi KHV pada ikan mas transgenik F-2 dan non-transgenik (Majalaya) yang mati setelah uji tantang KHV; M= marker DNA; (+)= kontrol positif KHV; (-)= kontrol negatif; 1-4= transgenik; 5-9= non-transgenik

Figure 5. KHV detection in dead fish of F-2 transgenic common carp and non-transgenic (Majalaya) after KHV challenge test; M= DNA marker; (+)= positive control of KHV; (-)= negative control; 1-4= transgenic; 5-9= non-transgenic

bertahan hidup merupakan ikan mas yang memiliki ketahanan terhadap infeksi KHV.

Parameter lain yang mendukung pada uji tantang KHV juga diamati pada penelitian ini meliputi gejala klinis dan suhu air pengujian. 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).

Suhu air yang terukur selama pengujian berada pada kisaran yang permisif bagi perkembangan KHV yaitu berkisar antara 20°C-22°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%.

KESIMPULAN

Transmisi gen krt-GP11 pada ikan mas transgenik keturunan F-2 relatif rendah yaitu berkisar 0%-2%. Ikan mas transgenik F-2 memiliki ketahanan terhadap infeksi KHV yang relatif tinggi dengan sintasan uji

tantang sebesar 90%. Keberadaan marka Cyca-DAB1*05 berperan terhadap ketahanan ikan mas transgenik terhadap infeksi KHV selain transgen yang diperkenalkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara (APBN) melalui DIPA Tahun Anggaran 2015 di Balai Penelitian Pemuliaan Ikan, Sukamandi. Terima kasih disampaikan kepada semua teknisi yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada dewan redaksi untuk semua saran, masukan, dan perbaikan terhadap makalah ini.

DAFTAR ACUAN

- Alimuddin, Mubinun, Santika, A., Charman, O., Faizal, I., & Sumantadinata, K. (2011). Identification of Majalaya common carp strains resistant to KHV infection using Cyca-DAB1*05 allele as the marker. *Indonesian Aquaculture Journal*, 6(2), 157-163.
- 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.
- Ariyanto, D., Syahputra K., & Himawan, Y. (2015). Naskah akademik pelepasan varietas unggul ikan mas Rajadanu tahan penyakit koi herpesvirus (KHV). Balai Penelitian Pemuliaan Ikan. Sukamandi, 90 hlm (Unpublish).
- Chiou, P.P., Chen, M.J., Lin, Chun-Mean., 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., & Hew, Choy-Leong. (1995). Transmission and phenotypic effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus 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, 338-344.
- Dunham, R.A. (2009). Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2, 139-161.
- 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.
- Figueiredo, M.de.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., & Marins, L.F. (2007). Improving the production of transgenic fish germlines: *In vivo* evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genetic and Molecular Biology*, 30(1), 31-36.
- Gillad, O., Yun, S., Adkison, M.A., Way, K., Willits, N.H., Bercovier, H., & Hedrick, 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.
- Gray, W.L., Mullis, L., LaPatra S.E., Groff, J.M., & Goodwin, A. (2002). Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *Journal of Fish Diseases*, 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.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., D'Mello, F., Horward, C.R., Mackie, A., Dixon, P.F., Chang, K.C., Ramstad, A., Midlying, P.J., & Russel, P.H. (2006). DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viremia of carp virus. *Vaccine*, 24, 4927-4933.
- Kim, H.C., Johnson, M.C., Drennan, J.D., Simon, B.E., Thomann, E., & Leong, Jo-Ann.C. (2000). DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce non-specific immunity and mx protein synthesis in fish. *Journal of Virology*, 74(15), 7048-7054.
- 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.
- LaPatra, S.E., Corbeil, S., Jones, G.J., Shewmaker, W.D., Lorenzen, N., & Kurath, G. (2001). Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine*, 19, 4011-4019.
- Lu, Y., & Sun, P.S. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Res.*, 67, 141-146.
- Macleay, N. (1998). Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutat Res.*, 399, 255-266.
- Pusat Pengembangan Ikan Mas Nasional [(PPIMN)]. (2012). Protokol pemuliaan ikan mas (*Cyprinus carpio*). Sukabumi, 44 hlm (Unpublish).
- Rakus, K.L., Wiegertjes, G.F., Adamek, M., Siwicki, A.K., Lepa, A., & Irnazarow, I. (2009). Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 737-743.
- 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.
- Sarmasik, A., Warr, G., & Chen, T.T. (2002). Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar. Biotechnol.*, 4, 310-22.
- Sucipto, A., Faridah, N., Mundayana, Y., Haniyanti, D., Santika, A., Mawardi, M., Handayani, D.I., Prayoga, T., Purwanto, J., Juanda, T., & Dimiyati, A. (2014). Naskah akademik ikan mas (*Cyprinus carpio*) Majalaya tahan penyakit. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar. Sukabumi, 38 hlm (Unpublish).
- Sunarto, A., Rukyani, A., & Itami, T. (2005). Indonesian experience on the outbreak of Koi Herpes Virus in koi and carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Fish. Res. Agen. Supplement*, 2, 15-21.

- Syahputra, K., Himawan, Y., & Ariyanto, D. (2014). Evaluasi ketahanan ikan mas (*Cyprinus carpio*) transgenik yang membawa gen glikoprotein terhadap Koi Herpesvirus (KHV). Dalam Sugama, K., Kusnendar, E., Rachmansyah, Giri, N.A., Yuhana, M., Kristanto, A.H., Imron, Radiarta, I N., & Dewi, R.R.S.P.S (Eds.). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya. Jakarta, hlm. 1075-1081.
- 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.
- 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.
- Zhong, C., Song, Y., Wang, Y., Li, Y., Liao, L., Xie, S., Zhu, Z., & Hu, W. (2012). Growth hormone transgene effects on growth performance are inconsistent among offspring derived from different homozygous transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 356-357, 404-411.