

Inseri gen lisozim pada ikan patin siam *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) untuk membentuk galur tahan penyakit

[Lysozyme gene insertion in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) to generate disease resistance breeds line]

Wartono Hadie^{✉1}, Sularto², Lies Emmawati Hadie¹, Angela Mariana Lusiastuti³, Alimuddin⁴, Evi Tahapari², Huria Marnis²

¹ Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan Budidaya Balitbang KP
Jl. Ragunan 20, Pasar Minggu, Jakarta Selatan 12540

² Balai Penelitian Pemuliaan Ikan
Jl. Raya 2, Sukamandi Pantura, Subang

³ Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar
Jl. Sempur No.1 Bogor

⁴ Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Diterima: 11 Mei 2014; Disetujui: 26 Mei 2015

Abstrak

Serangan penyakit bakterial pada ikan patin telah banyak merugikan para pembudi daya ikan patin terutama pada segmen perbenihan hingga ukuran siap tebar. Oleh karena itu diperlukan teknologi yang mampu menghasilkan ikan patin yang tahan penyakit. Berkaitan dengan hal itu, salah satu enzim antimikroba yaitu lisozim yang memainkan peranan penting dalam imunitas bawaan dapat diintroduksi ke dalam genom ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi keberhasilan inseri gen lisozim ke dalam genom ikan patin siam sebagai galur ikan patin tahan penyakit. Transfer gen dilakukan dengan menggunakan teknik elektroporasi pada spermatozoa ikan patin siam. Elektroporasi dilakukan dengan konstruksi gen lisozim berupa plasmid DNA dosis $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ dengan voltase $125 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, panjang kejutan 30 milidetik dengan interval kejutan 0.1 milidetik dan jumlah kejutan lima kali. Spermatozoa hasil elektroporasi digunakan untuk membuahi telur. Pengujian keberhasilan inseri gen lisozim dilakukan pada tahap embrio larva, dan pada benih. Hasil pengujian, baik pada tingkat DNA maupun pada tingkat RNA dari sampel spermatozoa dan larva (*whole cell*), memperlihatkan hasil yang positif. Individu ikan patin yang membawa gen lisozim dan telah terintegrasi ke dalam genomnya akan digunakan sebagai kandidat dalam pembentukan galur ikan patin tahan penyakit.

Kata penting: elektroporasi, gen lisozim, ekspresi gen, RNA, DNA, daya tahan penyakit

Abstract

Bacterial disease in catfish has many detrimental to farmers, especially in the larvae stadium in the hatchery up to ready size of stocking seed. Therefore we need technology that can produce disease resistant of catfish. In that regard, one of the antimicrobial enzyme namely lysozyme which plays an important role in the maternal immunity can be introduced into the catfish genome. This study aimed to evaluate the success of the lysozyme gene insertion into the genome of striped catfish to generate maternal disease resistance. Gene transfer method was done by using electroporation on striped catfish spermatozoa. Lysozyme plasmid electroporation performed with a dose $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and $125 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, pulse length 30 milliseconds with a pulse interval 0.1 milliseconds and pulse number 5 times. Electroporated spermatozoa were used to fertilize the egg. Lysozyme gene insertion success was indicated by tests performed on embryogenesis, larval, and seed stage. The test results at both DNA and RNA level showed a positive result. Individual that brings the lysozyme gene will be used as a candidate for breed line maternal immune as other ways to formation of resistant disease varieties.

Keywords: *electroporation, lysozyme gene, gene expression, RNA, DNA, disease resistance*

Pendahuluan

Serangan penyakit bakterial pada ikan patin merugikan para pembudidaya ikan terutama

pada segmen pembenihan hingga ukuran siap tebar (panjang 5-8 cm dan bobot 3-5 gram). Kerugian yang diderita oleh para pengusaha benih ikan patin mencapai milyaran rupiah (Hadie *et al.* 2010a). Salah satu upaya untuk mengatasi

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: tono_hadi@yahoo.com

masalah tersebut adalah melalui teknologi transfer gen untuk menghasilkan ikan yang tahan penyakit.

Lisozim sebagai enzim antimikroba, diyakini memainkan peran penting dalam imunitas bawaan (Magnadttir *et al.* 2005). Enzim ini efektif untuk melawan bakteri terutama jenis gram positif (Hikima *et al.* 2003). Dengan demikian inseri gen lisozim pada ikan secara umum mampu meningkatkan kinerja sistem kekebalan ikan terhadap bakteri. Enzim ini juga berperan dalam fagositosis bakteri (Saurabh & Sahoo 2008). Lisozim terdapat pada mucus, darah dan jaringan lain, terutama ginjal (Balfry & Iwama 2004, Fernandes *et al.* 2004). Lisozim juga ditemukan di dalam telur yang telah dibuahi dan diyakini berperan dalam mencegah penularan bakteri patogen dari induk kepada keturunannya.

Melihat pentingnya lisozim sebagai sistem kekebalan bawaan yang potensinya berspektrum luas, maka dapat dijadikan kandidat gen untuk transfer gen dalam rangka meningkatkan kekebalan pertahanan ikan. Sistem budi daya perikanan bergantung kepada tiga komponen utama, yaitu biota (penggunaan benih unggul), pakan (harus tepat jumlah dan mutu), dan lingkungan (termasuk kesehatan lingkungan). Hambatan yang sering terjadi pada kegiatan budi daya ikan adalah kesehatan lingkungan yang kurang memadai, di antaranya hadirnya patogen pada lingkungan budi daya.

Bakteri jenis *Aeromonas* merupakan suatu kelompok bakteri yang tersebar luas di alam. *Aeromonas* mesofilik dikenali sebagai bakteri yang bertanggung jawab untuk beberapa penyakit. *A. hydrophila* merupakan spesies yang paling mematikan (*phenospecies*) di antara kelompok mesofilik. *A. hydrophila* menyebabkan pendarahan pada amfibi dan ikan seperti extraintestinal dan infeksi atau peradangan luka dalam, *gastro-*

enteritis, *cellulitis*, radang selaput otak, radang sumsum tulang belakang, infeksi atau peradangan jaringan, radang selaput perut, infeksi/peradangan *bronchopulmonary*, dan infeksi/peradangan pada manusia.

Ikan patin pasupati yang telah memiliki laju pertumbuhan yang cepat masih dapat ditingkatkan lagi ketahanannya terhadap penyakit melalui introduksi gen antibakteri lisozim. Lisozim adalah enzim yang bertindak sebagai hidrolase yang merusak ikatan beta 1-4 pada lapisan peptidoglikan dinding bakteri. Organisme multiseluler mampu mempertahankan diri dengan sistem kekebalan bawaan atau kekebalan nonspesifik (*innate immune system*), baik secara fagositik maupun sekresi larutan antimikrobal (Tort *et al.* 2003).

Introduksi gen lisozim ke dalam genom ikan patin untuk menghasilkan ikan yang memiliki komponen gen antibakteri dapat melindungi diri dari patogen lingkungan yang tidak dapat dikendalikan dengan baik. Kemampuan inkorporasi gen tersebut diharapkan dapat memberi kekebalan yang memadai, sehingga menjadikan ikan sebagai komponen budi daya yang unggul.

Fletcher *et al.* (2011) menjelaskan bahwa pada ikan salmon (*Salmo salar* L) yang ditransfer dengan gen lisozim, ditemukan gen tersebut dalam jumlah yang banyak pada semua organ tubuhnya, walaupun belum diketahui ketahanan terhadap penyakitnya. Namun demikian Grinde (1989) mengemukakan bahwa ikan yang memiliki banyak lisozim mampu melawan bakteri baik gram positif maupun gram negatif, walaupun pada bakteri gram negatif diperlukan komplemen. Dengan demikian kehadiran lisozim dalam tubuh ikan berdampak kepada meningkatnya kemampuan ikan untuk melawan penyakit bakterial.

Transfer gene pertumbuhan (GH) pada ikan patin, juga telah dilakukan Dewi *et al.*,

(2012) dengan menggunakan metode elektroporasi pada spermatozoa. Metode tersebut juga dapat diterapkan untuk transfer gen lainnya pada ikan patin yang disesuaikan dengan karakter gen yang diinsersikan.

Metode transfer gen pada ikan patin telah dilakukan oleh Dewi *et al.* (2013), yang selanjutnya dapat digunakan sebagai model transfer gen pada ikan patin. Transfer gen dilakukan melalui cara elektroporasi spermatozoa menggunakan alat Gene Pulser II (Biorad, USA). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi keberhasilan insersi gen lisozim ke dalam genom ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*) sebagai kandidat galur ikan patin tahan penyakit.

Bahan dan metode

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2012-2013. Pematangan dan pemijahan induk ikan patin dilakukan di kolam percobaan Balai Penelitian Pemuliaan Ikan (BPPI) Sukamandi. Perlakuan transgenik, pembuahan, penetasan, dan pemeliharaan larva dilakukan di Laboratorium Biotek BPPI Sukamandi. Konstruksi gen dan perbanyakan plasmid dilakukan di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ikan Departemen Budidaya Perairan FPIK, IPB Bogor. Pemeliharaan ikan produk transgenik dilakukan di kolam percobaan BPPI Sukamandi.

Ikan uji

Ikan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan patin jambal (*Pangasius djambal*) jantan dan betina, sedangkan ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*) hanya digunakan induk betina. Ikan patin jambal digunakan sebagai sumber gamet jantan (sperma) pembawa gen lisozim. Spermatozoa yang telah membawa

gen lisozim digunakan untuk membuahi telur ikan patin jambal guna memperoleh ikan patin jambal jantan pembawa gen lisozim. Selain itu spermatozoa pembawa gen lisozim juga digunakan untuk membuahi telur ikan patin siam guna memperoleh induk betina pembawa gen lisozim.

Transfer gen lisozim

Gen lisozim yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ikan, Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB Bogor. Transfer gen lisozim dilakukan pada konsentrasi DNA plasmid 100 µg ml⁻¹. Transfer gen dilakukan dengan menggunakan metode elektroporasi dengan perantara sperma. Elektroporasi sperma dilakukan dengan menggunakan mesin *Gene Pulser II* (Biorad, USA). Sperma diencerkan dengan menggunakan larutan fisiologis (1 : 1) sebelum dicampur dengan plasmid. Elektroporasi dilakukan dengan tipe kejutan *square wave* dengan panjang kejutan (*pulse length*) 30 milidetik dan interval kejutan (*pulse interval*) 0,1 detik, kuat medan listrik (*electric field strength*) 125 V.cm⁻¹, dan jumlah kejutan (*pulse number*) lima kali.

Pembuahan hingga pemeliharaan larva

Pembuahan telur dengan sperma yang telah membawa gen lisozim dilakukan pada wadah plastik dengan volume 200 ml yang berisi ± 200 butir telur dan dibiarkan dalam wadah tersebut hingga menetas. Setiap enam jam, air media penetasan diganti dengan air mineral (Aqua®) untuk menjaga kualitas air tetap baik. Setelah menetas, larva dipindahkan ke dalam akuarium dan dipelihara hingga ukuran 3 inci, kemudian dipindahkan ke dalam jaring di kolam untuk dipelihara hingga dewasa.

Efektivitas transfer gen lisozim

Keberhasilan transfer gen lisozim diidentifikasi pada sperma. Sebelum dianalisis sperma dicuci dahulu menggunakan DNase. Identifikasi keberhasilan transfer gen pada embrio dilakukan dengan cara menganalisis 25 embrio yang berumur 25 jam setelah pembuahan digabung menjadi satu sampel. Selanjutnya dilakukan proses PCR untuk mendeteksi keberadaan gen lisozim. Primer yang digunakan adalah GFP-R (5'-TAT GAA GGT TAT GCT CTG CCC-3') dan GFP-R (5'-CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3'). Ukuran fragmen transgen (lisozim) adalah 600 bp. Proses PCR dilakukan pada kondisi: denaturasi (94°C, 30 detik), annealing (55°C, 30 detik) dan ekstensi (72°C, 1 menit) sebanyak 35 siklus. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%.

Analisis ekspresi gen lisozim pada ikan patin

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan kit Tri Reagent (*Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA*). Tingkat kemurnian dan kuantitas RNA diukur menggunakan qubit® 2.0 fluourometri (*Invitrogen*). RNA hasil ekstraksi disintesis menjadi cDNA menggunakan kit Ready-To-Go™ RT-PCR Beads (*GE Healthcare*).

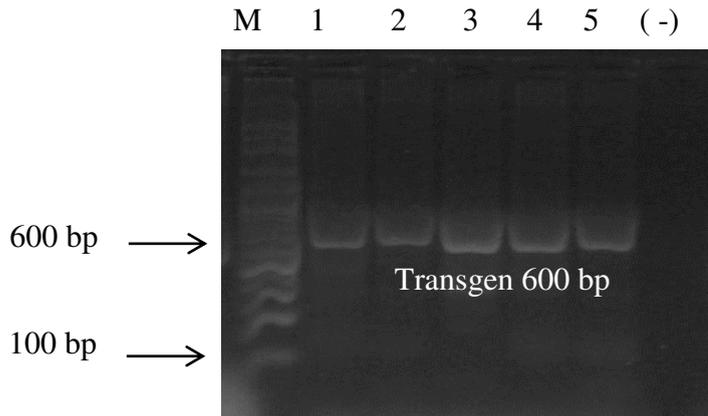
Ekspresi gen lisozim pada larva

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) menggunakan alat *thermal cycler mycycler* (Biorad) yang diprogram dengan 25 siklus. Sebanyak 2 µl cDNA digunakan sebagai templet untuk PCR dan 1 µl primer GFP-R

(5'-TAT GAA GGT TAT GCT CTG CCC-3') dan GFP-R (5'-CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3'). Proses PCR transgen (lisozim) dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit, dengan ukuran transgen adalah 600 bp. Sebagai internal kontrol digunakan β-aktin dengan primer bact-F (5'-TAT GAA GGT TAT GCT CTG CCC-3') dan bact-R (5'-CAT ACC CAG GAA AGA TGG CTG-3') (Dewi *et al.* 2012). Panjang fragmen β-aktin ikan patin yang diapit oleh kedua primer tersebut sekitar 300 bp. Proses PCR β-aktin dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 48°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit, sebanyak 25 siklus. Amplikon dipisahkan menggunakan gel agarose 2,0%.

Hasil

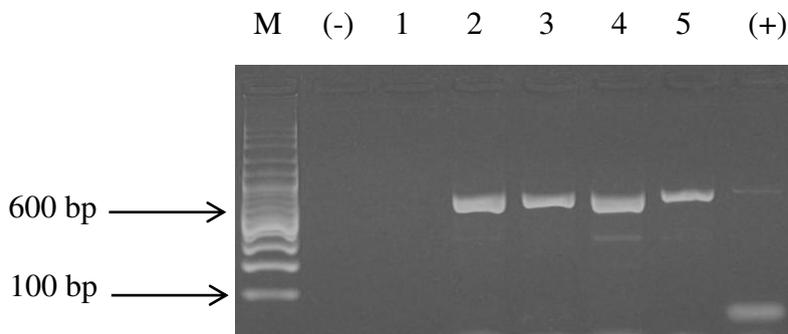
Sperma yang dielektroporasi mampu membawa gen lisozim dan dapat terdeteksi pada sperma (Gambar 1). Pada penelitian ini, keberadaan gen lisozim pada embrio 25 jam setelah pembuahan dan larva 25 jam setelah penetasan ikan patin terdeteksi pada ukuran 600 bp (Gambar 2). Penggunaan konsentrasi DNA plasmid 100 µg ml⁻¹ mampu menunjukkan keberhasilan inseri gen lisozim pada ikan patin yang dianalisis (Gambar 3). Hasil analisis ekspresi gen pada RNA ikan transgen lisozim juga terlihat pada larva ikan patin, hal ini menunjukkan ekspresi gen tersebut mulai nampak (Gambar 4).



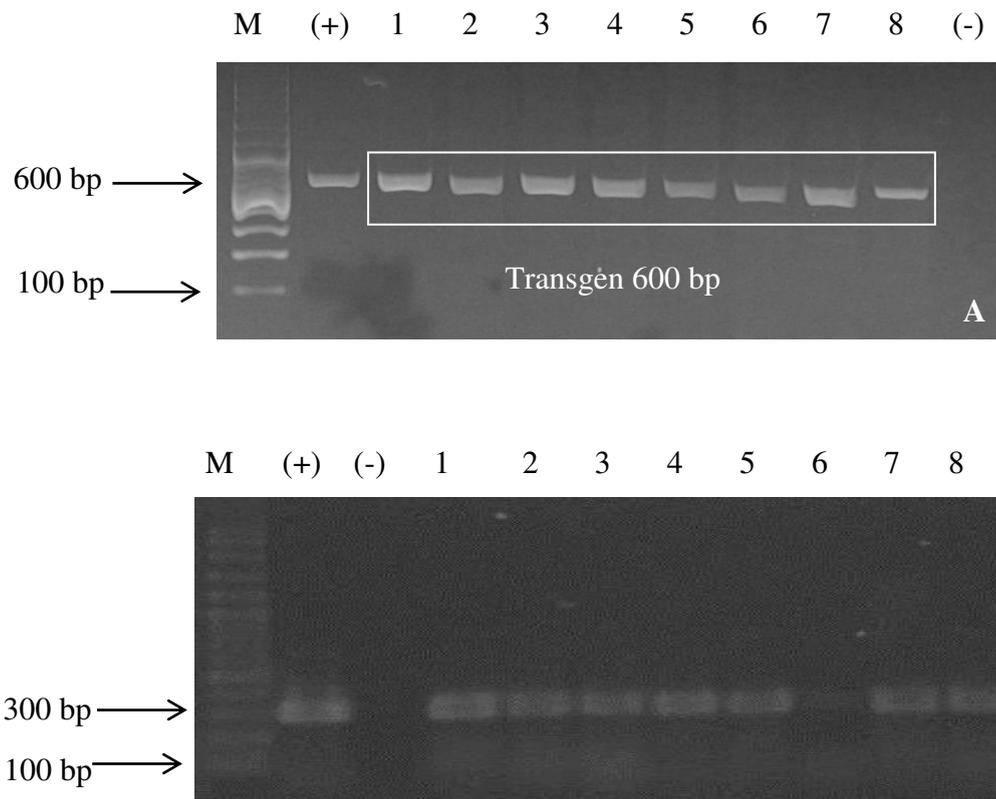
Gambar 1. Deteksi transgen (lisozym) pada sperma ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*) menggunakan metode PCR. Tanda (-) = kontrol negatif PCR, tanda (+) = kontrol positif plasmid (pMSH1-Lys). Nomor 1-5 = Sampel sperma ikan patin siam. M = marker DNA 100-3000 bp (Vivantis). Ukuran fragmen transgen 600 bp.



Gambar 2. Deteksi transgen pada embrio dan larva ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*) menggunakan metode PCR. Tanda (-) = kontrol negatif PCR, tanda (+) = kontrol positif plasmid (pMSH1-Lys). E1, E2 dan E3 = sampel embrio setelah 1 jam fertilisasi. Nomor 1 dan 2 = kontrol tanpa plasmid pMSH1-Lys dan tanpa perlakuan elektroporasi. Nomor 3 dan 4 = kontrol tanpa plasmid pMSH1-Lys dan perlakuan elektroporasi. Nomor 5 dan 6 = kontrol ditambah plasmid pMSH1-Lys dan tanpa perlakuan elektroporasi. L1, L2 dan L3 = sampel larva setelah 25 jam memetas. M = marker DNA 100-3000 bp (Vivantis). Ukuran fragmen transgen 600 bp.



Gambar 3. Deteksi transgen pada beberapa individu yang akan dijadikan P₀ (*founder*) ikan patin siam dengan menggunakan metode PCR. Nomer 1-5= individu ikan patin transgenik *Founder*. Tanda (-) = kontrol negatif PCR, tanda (+) = kontrol positif plasmid (pMSH1-Lys). M = marker DNA 100-3000 bp (Vivantis). Ukuran fragmen transgen 600 bp.



Gambar 4. Analisis ekspresi transgen pada larva ikan patin siam dengan menggunakan metode RT-PCR. (A). Ekspresi transgen (lisozym) pada larva. (B). Ekspresi gen β -aktin pada larva. Nomer 1-8 = sampel larva ikan patin transgenik. Tanda (-) = kontrol negatif PCR, tanda (+) = kontrol positif plasmid (pMSH1-Lys). M = marker DNA 100-3000 bp (Vivantis). Ukuran fragmen transgen 600 bp. Gen β -aktin digunakan sebagai internal kontrol dengan ukuran fragmen 300 bp.

Pembahasan

Sperma yang dielektroforasi mampu membawa gen lisozim, hal ini membuktikan bahwa teknik yang digunakan sesuai (Gambar 1). Interaksi antara DNA eksogen dan sel sperma bukan merupakan peristiwa yang acak, tetapi merupakan proses yang teratur yang diperantarai oleh faktor-faktor spesifik. Kemampuan spermatozoa dari hampir semua spesies untuk mengikat DNA asing telah terdokumentasi dengan baik. Individu yang ditransformasi secara genetik dari berbagai spesies telah diperoleh dengan menggunakan sel sperma sebagai vektor dari DNA asing. Hasil-hasil observasi ini menunjukkan bahwa transfer gen dengan mediasi sperma (SMGT) jika dikembangkan lebih jauh, dapat diterapkan dengan baik

untuk tujuan bioteknologi dan dapat digunakan sebagai alat untuk transformasi transgenik pada hewan-hewan yang sulit dilakukan mikroinjeksi. Pada perkembangan dalam bidang perikanan teknik tersebut juga telah dilakukan pada ikan mas komet (Hadie *et al.* 2010b) dan pada ikan patin (Dewi *et al.* 2012). Hal tersebut menunjukkan bahwa transfer gen menggunakan mediasi sperma bisa dilakukan pada berbagai jenis ikan dan berbagai tujuan, termasuk gen tahan penyakit pada ikan patin.

Pada saat sel sperma atau sel telur dielektroporasi, aplikasi kejutan listrik pada suspensi sel menginduksi polarisasi komponen membran sel dan mengembangkan potensi tegangan di seluruh membran. Penelitian mula-mula yang dila-

kukan oleh Knight & Scrutton (1986), dilaporkan bahwa pada saat perbedaan potensial antara bagian dalam dan luar membran sel melewati titik kritis, komponen membran di-reorganisasi ke dalam pori dalam area terlokalisasi, dan kemudian sel menjadi permeabel terhadap masuknya makromolekul. Kondisi demikian merupakan kesempatan gen lisozim untuk masuk ke dalam membran spermatozoa. Dengan demikian spermatozoa mampu membawa material gen pada saat terjadinya fusi gamet membentuk zigot dan akan terus berkembang membentuk individu dewasa.

Keberhasilan pengantaran gen yang dilakukan oleh spermatozoa dibuktikan dengan masuknya materi gen ke dalam zigot (Gambar 2). Fusi spermatozoa pembawa gen lisozim ke dalam sel telur membuat semua materi yang dibawa oleh spermatozoa dan sel telur melebur menjadi satu. Fusi ini ikut membentuk rantai DNA baru pada genom zigot. Gen lisozim yang terpendai dalam embrio membuktikan bahwa gen telah berhasil dibawa masuk ke zigot namun untuk mengetahui inkorporasinya ke dalam DNA genom perlu diikuti pada individu larva hingga dewasa.

Terpendainya gen lisozim pada larva (Gambar 3), membuktikan bahwa gen lisozim telah mampu menyatu dengan genom ikan patin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya aktivitas RNA yang terpendai pada stadia larva (Gambar 4). Fletcher *et al.* (2011) melaporkan bahwa konsentrasi DNA yang tinggi meningkatkan efisiensi pengikatan DNA oleh sperma, dan meningkatkan efisiensi transfer pada telur. Namun demikian hasil penelitian Hadi *et al.* (2010b) memperlihatkan bahwa dosis $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cukup efektif untuk ikan komet (*Carasius auratus*). Dengan demikian dosis tersebut telah dapat diguna-

kan sebagai dosis rujukan untuk berbagai jenis ikan dalam transfer gen melalui elektroporasi.

Gen lisozim yang ditemukan pada beberapa organ ikan mengindikasikan bahwa gen yang ditransfer telah terangkai ke dalam DNA genom ikan. Namun demikian ekspresi gen tersebut perlu dibuktikan lebih lanjut apakah gen turut aktif dalam sintesis protein atau tidak. Aktivitas sintesis protein dari DNA dengan lisozim baru dapat diukur dengan indikator RNA (Gambar 4). Terpendainya RNA pada individu ikan transgen membuktikan dengan jelas bahwa penyisipan gen lisozim ke dalam genom ikan patin telah bekerja dengan baik.

Dengan terekspresinya hingga taraf RNA, maka aktivitas lisozim pada saat dibutuhkan juga dapat berfungsi dengan baik. Namun demikian pada generasi selanjutnya efektivitas gen lisozim transgen ini perlu dibuktikan melalui uji tantangan terhadap bakteri penyebab penyakit ikan patin.

Level ekspresi gen dari individu transgen bervariasi di antara individu transgenik. Hal ini dikarenakan antara lain oleh bervariasinya kualitas transgen yang terintegrasi dan situs integrasi pada individu yang berbeda. Mekanisme kerja lisozim pada saat terjadi infeksi maka jaringan akan mengekspresikan gen untuk menghasilkan lisozim yang akan dikirimkan ke daerah terinfeksi sebagai bagian dari respons imun. Pada udang (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) ekspresi transkripsi lisozim akan terjadi pada empat jam setelah infeksi yang meningkat secara nyata pada jaringan sekitar infeksi dan pada hemosit (Burge *et al.* 2007). Dengan demikian gen lisozim yang diinsersikan ke dalam genom akan diekspresikan dengan mudah jika terjadi infeksi bakteri.

Individu ikan patin siam hasil transfer gen, akan dipelihara hingga mencapai dewasa dan matang gonad. Individu-individu tersebut selan-

jutnya akan digunakan sebagai induk utama (P_0) dalam program seleksi. Pembentukan populasi induk tahan penyakit hasil transfer gen dapat dilakukan dengan membentuk induk ikan patin (P_0) dilanjutkan dengan pembentukan generasi baru (G_1) homozigot lisozim yaitu dengan mengawinkan induk positif dengan induk yang tidak diperlakukan dengan lisozim. Individu-individu homozigot lisozim (F_1) kemudian dilakukan seleksi untuk melihat pola pewarisan sifat tahan penyakit dalam program pemuliaan (*selective breeding*).

Menurut Fletcher *et al.* (2011), gen lisozim eksogen dapat diwariskan kepada generasi berikutnya mengikuti pola Mendel. Pada ikan salmon (*Salmo salar* L) hasil transfer gen, gen eksogen dapat diturunkan secara komplet pada dua generasi berikutnya (F_1 dan F_2). Walaupun terdapat sedikit perbedaan pada lokasi kodon empat asam amino dibanding dengan referensi Gene Bank. Namun demikian lisozim dapat terekspresi pada hampir seluruh organ dalam dan sirip (ekstrimitasnya). Bahkan pada F_2 ikan salmon, aktivitas lisis dari lisozim pada ikan transgenik dapat meningkat 40% dibanding dengan non transgenik. Dengan demikian individu ikan patin yang telah membawa gen lisozim eksogenus tersebut diharapkan memiliki heritabilitas yang tinggi atau kemampuannya menanggulangi penyakit dapat diwariskan kepada generasi selanjutnya.

Dari sisi program seleksi, hasil ini memberi gambaran bahwa sistem pewarisan gen yang diinsersikan ke dalam genom mengikuti pola Mendel dapat berjalan dengan baik. Ini berarti bahwa pola perkawinan yang diatur dalam seleksi dapat dirancang dan hasilnya dapat diprediksi dengan baik. Induk ikan patin yang telah membawa gen lisozim sangat bermanfaat sebagai komponen dalam penggabungan gen (Hadie *et*

al. 2010c). Seleksi pada individu pembawa gen lisozim dapat diarahkan melalui pembentukan individu homozigot pada F_1 , dan selanjutnya dapat diperoleh induk yang tahan penyakit pada generasi selanjutnya.

Berhasilnya transfer gen kedalam ikan salmon (Hew & Fletcher 2001) menunjukkan bahwa peningkatan kekebalan dapat dicapai dengan menciptakan salmon transgenik menggunakan satu atau lebih dari gen yang bertanggung jawab untuk kekebalan pada ikan. Hal serupa diharapkan terjadi juga pada ikan patin yang memiliki gen lisozim yang dapat terekspresi dengan baik.

Penemuan gen yang bertanggung jawab untuk kekebalan bawaan telah membuat kemajuan yang cukup selama beberapa tahun terakhir. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa selain lisozim, terdapat sejumlah antimikroba/antibakteri protein lain dan peptida yang berfungsi untuk mempertahankan terhadap patogen yang bersifat infeksi (Patrzykat & Douglas 2005). Peningkatan pertahanan bawaan ini cukup signifikan dan dapat diharapkan untuk meningkatkan kapasitas individu untuk menetralkan potensi invasif mikroba, meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup (Fletcher *et al.* 2011).

Di Indonesia budi daya ikan patin secara umum telah mengalami kerugian yang besar baik pada tahap pembenihan, pendederan, maupun pembesaran akibat adanya serangan penyakit bakterial. Kerugian yang ditimbulkan oleh jenis bakteri *Aeromonas* di unit pembenihan rakyat (UPR) berupa menurunnya produksi benih, karena tingginya tingkat kematian benih pada tingkat larva sampai umur 14 hari. Kematian larva di UPR umumnya terjadi pada minggu pertama (umur empat hari) dan secara umum terjadi kematian terbesar hingga umur 14 hari. Kematian benih umumnya disebabkan oleh penyakit, yang ditimbulkan akibat tidak menerapkan prinsip bio-

sekuritas. Pada sistem pemeliharaan di UPR yang sangat sederhana, kematian akibat penyakit bisa mencapai 95-100% (Hadie *et al.* 2010a). Masalah tersebut dapat diatasi jika pencegahan penyakit dapat dilakukan baik melalui terapi maupun dengan cara penyediaan induk unggul tahan penyakit, termasuk transgenik lisozim.

Simpulan

Metoda insersi gen lisozim ke dalam genom ikan patin siam dapat dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforasi pada spermatozoa. Keberhasilan penggabungan gen ke dalam genom ikan patin dapat terdeteksi pada spermatozoa, zigot dan embrio, fase larva, dan fase benih. Ekspresi gen lisozim pada tingkat RNA juga memperlihatkan keberhasilan penggabungan gen lisozim sebagai kandidat gen tahan penyakit pada calon induk ikan patin sebagai parental (*founder*) untuk membentuk benih unggul tahan penyakit.

Daftar pustaka

- Balfry SK, Iwama GK. 2004. Observation on the inherent variability of measuring lysozyme activity in Coho salmon *Onchorhynchus kisutch*. *Journal Comparative Biochemistry and Physiology*. 138B: 207-211.
- Burge EJ, Madigan DJ, Burnett LE, Burnett KG. 2007. Lysozyme gene expression as a molecular marker of hemocyte location in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22(4): 327-339.
- Dewi RRSPS, Alimuddin, Sudrajat AO, Sumanadinata K. 2012. Efektivitas transfer gen PhGH pada ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 7(2): 171-180.
- Dewi RRSPS, Alimuddin, Sudrajat AO, Sumanadinata K, Hayuningtyas EP. 2013. Pola ekspresi gen enhanced green fluorescent protein pada embrio dan larva ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 8(3): 339-346.
- Fernandes JMO, Kemp CD, Smith VJ. 2004. Two novel muramidases from skin mucosa of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 138B: 53-64.
- Fletcher GL, Hobb RS, Evans RP, Shears MA, Hahn AL, Hew CL. 2011. Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture Research*, 42(3): 427-440.
- Grinde B. 1989. A lysozyme isolated from rainbow trout acts on mastitis pathogens. *Microbiology Letters*, 60(2): 179-182
- Hadie W, Lusiastuti AM, Sularto, Tahapari E. 2010a. Imunitas maternal terhadap *Aeromonas hydrophila*: pengaruhnya terhadap fekunditas dan daya tetas ikan patin siam (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 5 (2): 229-235
- Hadie W, Kusriani E, Priyadi A, Alimuddin. 2010b. Penyisipan gen warna pada ikan *Carasius auratus* menggunakan metode elektroforasi dalam upaya meningkatkan kualitas ikan hias. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(3): 335-343.
- Hadie W, Tahapari E, Hadie LE, Sularto. 2010c. Efektivitas persilangan dalam peningkatan produktivitas ikan patin melalui hibridisasi antar spesies. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 10(2): 179-184.
- Hikima J, Hirono I, Aoki T. 2003. *The lysozyme gene in fish*. Aquatic Genome. Tokyo University of Fisheries. Tokyo. 301-309.
- Hew CL, Fletcher GL. 2001. The rule of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197(1-4): 191-204.
- Knight DE, Scrutton MC. 1986. Gaining access to the cytosol: the technique and some application of electroporation. *Biochemical Journal*. 234(3): 497-506.
- Magnadtir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5): 429-439.
- Patrzykat A, Douglas SE. 2005. Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection. *Protein and Peptide Letters*, 12(1): 19-25.
- Saurabh S, Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule for fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3): 223-239.
- Tort L, Balasch JC, Mackenzie S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia*, 22(3): 277-286.