TRANSPLANTASI SEL TESTIKULAR IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*) PADA LARVA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) AWAL MENETAS

TRANSPLANTATION OF GIANT GOURAMY (*Osphronemus gouramy*) TESTICULAR CELLS IN EARLY HATCHING NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Jasmadi^{1*}, Odang Carman², dan Alimuddin²

¹UPT Loka Konservasi Biota Laut Tual, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Indonesia.

²Budidaya Perairan, Institut Pertanian Bogor, Indonesia.

*E-mail: jasmadi.ipb06@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history

Received date:

29 October 2015

Received in revised form date:

01 December 2015

Accepted date:

07 June 2016

Available online date:

30 November 2016

Abstract

Cell transplantation technology has been widely developed in mammals, but less implemented in inland aquaculture fish. Giant gouramy (*Osphronemus gouramy*) is one of important commercial aquaculture commodities that has a relatively long first reproductive cycle compared to the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tilapia has a faster reproductive cycle and potential as giant gouramy surrogate broodstock. This study was aimed to applicate testicular cell transplantation technology of giant gouramy in tilapia larvae and to evaluate its success rate trough donor cell colonization. Tilapia larvae of 1-2dph (days post hatching) and 3-4dph were injected with ± 20.000 giant gouramy testicular cells in the peritoneal cavity, and then groomed for two months. Cell colonization of spermatogonium donor was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR), using giant gouramy F1-Growth Hormone and R1-Growth Hormone primers. The result of cell dissociation showed that a bigger giant gouramy (827g) had lower of spermatogonia composition (4.45%) than a smaller gouramy (608g) (14.96%). Donor cell colonization in 1-2dph recipient was higher (100%) than in 3-4dph recipient (75%). Whereas recipient Survival Rate (SR) was 89.34% for 1-2dph recipient and 98.96% for 3-4dph recipient respectively. This study suggests that testicular cell transplantation technology of giant gouramy could be applied to tilapia (Xenotransplantation) and cell transplantation has a better performance in 1-2dph than in 3-4dph recipients. With such success, there is a high potential that the giant gouramy cultivation can be increased through the cell transplantation technology.

Keywords: Transplantation, Giant gouramy, Testicular cells, Tilapia, Colonization

Kata kunci:

Transplantasi
Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*)
Sel testikular
Ikan nila (*Oreochromis niloticus*)
Kolonisasi

Abstrak

Teknologi transplantasi sel sudah banyak dikembangkan pada mamalia tetapi belum banyak diterapkan pada ikan air tawar. Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) adalah salah satu komoditas akuakultur ekonomis penting tetapi relatif lama matang gonad pertama kali dibandingkan dengan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Ikan nila memiliki kemampuan matang gonad yang lebih cepat berpotensi sebagai induk semang ikan gurame. Penelitian ini bertujuan untuk mengaplikasikan transplantasi sel testikular ikan gurame ke larva ikan nila dan mengetahui tingkat keberhasilannya melalui kolonisasi sel donor. Larva ikan nila umur 1-2 dan 3-4 hari setelah menetas (hsm) diinjeksi ± 20.000 sel donor hasil disosiasi pada rongga peritoneal, kemudian dipelihara selama dua bulan. Kolonisasi sel donor ditentukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer F1GH dan R1GH gurame. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ikan gurame dengan bobot tubuh yang lebih besar (827g) memiliki komposisi spermatogonia lebih kecil (4,45%) dibanding donor 608g (14,98%). Tingkat kolonisasi sel pada resipien 1-2hsm lebih besar (100%) dibandingkan resipien 3-4hsm (75%). Sedangkan tingkat kelangsungan hidup resipien setelah injeksi adalah 89,34% pada resipien umur 1-2hsm, dan 98,96% pada resipien umur 3-4hsm. Penelitian ini menunjukkan bahwa teknologi transplantasi sel dapat diaplikasikan pada ikan gurame ke ikan nila (Xenotransplantasi), dan transplantasi sel menunjukkan hasil yang lebih baik pada resipien 1-2hsm daripada resipien 3-4hsm. Dengan keberhasilan tersebut produktivitas usaha pengembangan budidaya ikan gurame berpotensi untuk dapat ditingkatkan melalui teknik transplantasi.

PENDAHULUAN

Teknologi transplantasi adalah bagian dari bioteknologi yang saat ini banyak berkembang di mamalia. Transplantasi sel merupakan pemindahan sel donor ke resipien yang bertujuan untuk perekayasaan atau perbaikan fungsi organ pada resipien, misalnya untuk rekayasa produktivitas organ reproduksi. Pengembangan teknologi tersebut yang kemudian menjadi inspirasi penerapannya pada penelitian di bidang perikanan. Teknologi transplantasi sel germinal merupakan teknik yang dikembangkan pertama kali pada ayam, kemudian transplantasi sel spermatogonia pada mamalia (Brinster and Zimmermann 1994), sedangkan di bidang perikanan teknologi ini telah dikembangkan oleh (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003; Okutsu et al. 2006; dan Yoshizaki et al. 2010). Dengan teknologi tersebut ikan *rainbow trout* (donor) dapat dihasilkan dengan cara mengawinkan ikan salmon masu yang telah ditransplantasi. Walaupun demikian penelitian transplantasi pada ikan air tawar belum banyak dilakukan. Padahal keberhasilannya sangat membantu dalam peningkatan produktivitas dan nilai ekonomisnya. Hal ini diduga disebabkan adanya anggapan bahwa teknologi reproduksi konvensional masih dirasa cukup menguntungkan dan relatif murah di samping karena minimnya referensi teknologi ini pada ikan air tawar. Keberhasilan teknologi transplantasi tidak hanya terjadi pada jenis donor dan resipien yang dekat hubungan filogeninya (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2004) tetapi juga memberikan harapan terhadap objek yang jauh hubungan filogeninya (Yazawa et al. 2010; Majhi et al. 2009). Dengan demikian sangat memungkinkan teknologi ini untuk diaplikasikan pada jenis ikan air tawar yang bernilai ekonomi seperti nila, gurame, patin, lele, dan lain-lain.

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) yang merupakan ikan bernilai ekonomi

penting bagi pembudidaya ikan air tawar khususnya di Indonesia adalah jenis ikan yang memiliki umur matang gonad siap memijah relatif lama sekitar 30-36 bulan (SNI 2000) dan kekhasan rasanya membuat alasan favorit bagi konsumennya. Sebagai salah satu upaya peningkatan produktivitasnya diperlukan rekayasa reproduksi yang memerlukan induk pengganti, khususnya pada ikan yang lebih cepat matang gonad, seperti ikan nila. Teknologi transplantasi sel testikular ini sangat berpotensi jika diterapkan dengan menggunakan ikan nila sebagai induk pengganti (*surrogate broodstock*) dan ikan gurame sebagai donor.

Selain kekerabatan atau hubungan filogeni, umur resipien saat transplantasi juga menjadi salah satu faktor penentu keberhasilan transplantasi sel. Hal ini berkaitan dengan efisiensi kolonisasi dan adanya sistem imun resipien (Manning and Nakanishi 1996). Untuk mengetahui keberhasilan transplantasi sel pada ikan nila diperlukan kajian tentang faktor-faktor penentu tersebut. Oleh karena itu perlu adanya studi mengenai efektivitas keberhasilan transplantasi pada larva ikan nila dilihat dari umur larva setelah menetas. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji keberhasilan transplantasi sel testikular ikan gurame ke larva ikan nila dengan umur berbeda melalui kolonisasi sel donor.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Ikan resipien

Induk ikan nila yang digunakan dalam penelitian ini adalah *strain* nila *Bogor Enhanced Strain Tilapia* (BEST) (Gustiano 2009) yang diperoleh dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor. Bobot induk ikan nila yang digunakan adalah 350-500 g yang dipelihara dalam akuarium berdimensi

60x50x50 cm³ dan berisi air sebanyak $\frac{3}{4}$ bagian dari volume total akuarium. Aerasi diberikan sebagai suplai oksigen untuk kebutuhan ikan nila lebih dari 3ppm (SNI 2009). Setiap akuarium diisi satu induk ikan untuk mencegah terjadinya kontak fisik antar-ikan dan untuk memudahkan dalam pemijahan. Pakan (protein 35-40%) diberikan selama masa pemeliharaan 3-5 kali pada setiap harinya, agar nutrisi induk terpenuhi dengan baik dan untuk menjaga kualitas telur dan spermanya. Air disifon setiap hari dan diganti setiap tiga hari untuk menjaga kualitas air.

Ikan donor

Ikan gurame jantan dengan bobot 600-900 g/ekor diperoleh dari wilayah Kayumanis, Bogor, Jawa Barat. Sebelum diambil gonadnya untuk transplantasi ikan gurame dipelihara di hapa ukuran 3x1,5x1 m³ pada kolam pemeliharaan dan diberi pakan daun sente (*Alocasia macrorrhiza*) sampai dengan digunakan sebagai donor sel testikular.

Persiapan Resipien untuk Transplantasi

Induk ikan nila dipijahkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:1, kemudian telur dan sperma dikeluarkan dengan cara mengurut bagian perut (*stripping*) ke arah urogenital. Larutan NaCl 0,9% diberikan untuk menjaga kualitas telur sebelum dilakukan fertilisasi.

Sebanyak 150 butir telur dicampurkan dengan sperma sebanyak 0,15-0,2 ml (tanpa pengenceran) ke dalam cawan petri dan ditambahkan larutan fisiologis (NaCl 0,9%). Digunakan bulu ayam untuk mencampur telur dan sperma. Air ditambahkan ke dalam cawan petri berisi sperma dan telur, pada waktu pencampuran tersebut dihitung sebagai waktu fertilisasi yang kemudian diinkubasi dalam akuarium untuk proses penetasan. Larva hasil penetasan tersebut dipelihara dalam wadah yang sama sampai dilakukan proses transplantasi.

Penyediaan sel donor untuk transplantasi

Transplantasi diawali dengan penyiapan sel gonad ikan donor (ikan gurame jantan) melalui proses disosiasi. Ikan donor dibedah untuk diambil gonadnya dan dibersihkan dari lemak dan jaringan lain yang menempel. Gonad dipotong-potong menjadi ukuran sekitar 5 mm di dalam cawan petri dan dicacah selama 3-5 menit. Sebanyak 1-2 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) yang mengandung tripsin 0,5% ditambahkan, kemudian dicacah kembali 3-5 menit sampai keruh. Cacahan tersebut dipipet-teteskan (*pipetting*) menggunakan mikropipet sampai berbuih membentuk suspensi sel. Suspensi sel tersebut disaring dengan saringan 60 µm dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama sepuluh menit sampai sel mengendap. Supernatan dibuang dan diganti dengan PBS sebanyak 200-400 µl untuk menjaga sel agar tidak rusak dan memutus kerja dari tripsin. Suspensi sel dihomogenasi dan dihitung kepadatannya menggunakan hemositometer. Kepadatan sel diatur menjadi 20.000 sel/0,5 µl atau 40.000 sel/µl PBS sesuai dengan kebutuhan untuk transplantasi.

Transplantasi

Jarum mikroinjeksi dipasang pada *needle holder* dan diisi dengan minyak mineral yang terdapat pada alat micromanipulator yang terpasang dengan mikroskop “Stemi DV4, Zeiss”. Larva ikan nila umur 1-2 hari, umur 3-4 hari setelah penetasan diinjeksi sebanyak ± 20.000 sel. Larva hasil penyuntikan dipelihara sampai umur sekitar dua bulan di dalam akuarium 60x50x50 cm³. Ikan hasil penyuntikan diberikan pakan berupa cacing sutra selama dua minggu secara *ad satiation*. Selama pemeliharaan diberi pakan pellet F999 protein 38% secara *ad satiation*. Air disifon satu kali dalam sehari dan diganti 80% setiap

tiga hari. Kelangsungan hidup (SR) larva diamati sampai hari ke-7 setelah penyuntikan untuk mengetahui tingkat ketahanan larva terhadap penyuntikan.

Analisis PCR

Konfirmasi keberhasilan dari penyuntikan (mikroinjeksi sel testikular donor pada resipien) menggunakan analisis *polymerase chain reaction* (PCR). Ikan diambil secara acak dari populasi, DNA diekstraksi dari ikan resipien umur satu hari setelah penyuntikan menggunakan kit isolasi DNA (Gentra, Minneapollis-USA) dengan prosedur seperti dalam manual. DNA campuran (resipien dan donor) disimpan pada suhu -20°C atau langsung dilakukan proses PCR. Analisis kemurnian DNA hasil ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan GeneQuant. Sedangkan tingkat kolonisasi sel donor pada gonad resipien dapat diketahui dengan analisis PCR pada gonad ikan resipien dua bulan setelah penyuntikan.

PCR dilakukan menggunakan primer GH (*Growth hormone*) ikan gurame, yaitu F1GH (5'-TGTTCTCTGACGG-CGTGGTT-3') dan R1GH (5'-GCAACAAAAACCACCAGAAAGAG-3') dengan program seperti berikut. Pre-denaturasi 93°C selama tiga menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 45 detik, dan final ekstensi 72°C selama tiga menit, sebanyak 45 siklus (Achmad 2009). PCR untuk kontrol internal loading DNA dilakukan dengan menggunakan primer tiß-aktin (F: 5'-GTGCCCATCTACGAG-GGTTA-3' R : 5'-TTTGATGTCACG-CACGATTT-3') Elektroforesis dilakukan

pada gel agarosa 1% dan visualisasi DNA menggunakan sinar UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Disosiasi Sel Testikular Ikan Donor

Ikan gurame pada penelitian ini memperlihatkan hasil yang berbeda antar-individu. Jumlah spermatogonia pada donor 827g sebanyak 6.300.000 sel (4,45%) sedangkan pada donor 608g sebanyak 4.000.000 sel (14,98%) (Tabel 1). Hal ini juga berpengaruh terhadap persentase spermatogonia pada setiap donor, yaitu donor pertama dengan bobot tubuh yang lebih tinggi memiliki persentase spermatogonia yang lebih rendah (4,54%) dibandingkan dengan donor kedua (14,98%). Semakin tinggi bobot tubuh ikan gurame, maka semakin rendah persentase spermatogonia yang terkandung dalam gonadnya (Alimuddin, M. Zairin Jr., and Arfah 2009).

Gambar 1. Sel testikular ikan donor hasil disosiasi menggunakan PBS yang mengandung tripsin 0,5%. Spermatogonia ditunjukkan oleh anak panah.

Sel donor khususnya sel spermatogonia dalam bentuk tunggal (terpisah dari jaringan gonad dan sel germinal lainnya) yang *viable* (hidup) dan berpotensi untuk berkembang ataupun berdiferensiasi di dalam gonad resipien dapat diperoleh

Tabel 1. Hasil disosiasi sel gonad ikan donor, gurame

Donor	Bobot tubuh (g)	Bobot gonad (g)	Σ sel testikular (sel)	Jumlah spermatogonia (sel)	Persentase spermatogonia (%)
1	827	0,1513	138.625.000	6.300.000	4,54
2	608	0,1169	26.704.000	4.000.000	14,98

dengan cara disosiasi sel (pemisahan sel dari jaringan). Menurut Kobayashi et al. (2004), selain tingkat kemurnian sel donor, viabilitasnya juga dapat memengaruhi kemampuan diferensiasi menjadi sel germinal pada resipien. Pada penelitian ini telah berhasil diperoleh sel testikular hasil disosiasi gonad ikan donor menggunakan tripsin 0,5% di dalam larutan PBS. Disosiasi sel menggunakan *trypsin-phosphate buffer saline* (Trip-PBS) 0,5% dengan lama inkubasi kurang dari atau selama dua jam diperoleh suspensi sel testikular ikan gurame dengan viabilitas 96,77-100% (Alimuddin, M. Zairin Jr., and Arfah 2009). Berdasarkan kriteria ukuran sel spermatogonia ikan gurame (5-15 μm) (Mauluddin 2009), jumlah dan persentase sel spermatogonia hasil disosiasi sel testikular dapat dilihat pada Gambar 1.

Analisis PCR pada DNA Resipien 1 Hari Setelah Penyuntikan

Lima sampel (lane 1-5) yang diperiksa dengan PCR menggunakan marka molekuler spesifik GH-gurame memperlihatkan pita DNA sesuai dengan pita kontrol positif DNA ikan gurame (G) berukuran 340 pb (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa penyuntikan sel donor telah berhasil masuk ke rongga perut ikan resipien. Teknik PCR menggunakan primer spesifik tersebut telah diuji tingkat sensitivitas dan spesifitasnya (Achmad 2009). Teknik PCR ini mampu mendeteksi DNA ikan gurame dengan konsentrasi 1 ng/ μl di dalam 700 ng/ μl DNA ikan nila. Apabila konsentrasi DNA tersebut dikonversi ke dalam jumlah sel melalui analisis ekstraksi DNA menunjukkan bahwa teknik PCR tersebut mampu mendeteksi satu sel ikan gurame yang terdapat di dalam 10.000 sel ikan nila (Achmad 2009) atau dengan kata lain bahwa teknik PCR ini memiliki sensitivitas yang cukup tinggi. Dengan demikian nilai rasio jumlah sel donor yang disuntikkan

ke resipien (larva) diperkirakan lebih dari sama dengan satu berbanding 10.000 sel resipien.

Gambar 2. A) Analisis PCR DNA larva 1 hari setelah penyuntikan sel donor menggunakan marka molekuler spesifik GH-Gurame (konfirmasi keberhasilan penyuntikan). M, marker; 1-5, DNA sampel larva; G, DNA ikan gurame sebagai kontrol positif; N, DNA ikan nila sebagai kontrol negatif; (-) Kontrol bahan pada proses PCR. B) PCR menggunakan primer Ti β -actin sebagai kontrol internal.

Tingkat Kelangsungan Hidup Resipien

Tingkat kelangsungan hidup resipien tujuh hari setelah penyuntikan menunjukkan kecenderungan peningkatan seiring dengan semakin meningkatnya umur resipien pada saat penyuntikan dilakukan (Tabel 2). Terlihat bahwa tingkat kelangsungan hidup larva (*Survival Rate*) paling tinggi adalah kontrol, kemudian diikuti dengan perlakuan penyuntikan pada larva umur 3-4 hari (98,96%) dan paling rendah adalah perlakuan penyuntikan pada larva umur 1-2 hari (89,34%) (Tabel. 2). Diduga umur larva yang masih muda memiliki daya tahan tubuh lemah dan rentan terhadap gangguan fisik dari luar yang berupa teknis penyuntikan. Teknis penyuntikan ini berisiko mengenai organ lain yang dapat menyebabkan kerusakan organ sehingga larva mudah mati ketika selesai disuntik. Takeuchi et al. (2009) menyatakan bahwa *donor type A spermatogonia (type A SG)*, bahwa resipien yang lebih kecil memiliki tingkat kelangsungan hidup yang lebih kecil

juga. Keadaan ini diperlihatkan dengan menurunnya SR larva dari 63,3% (pada resipien ikan nibe larva ukuran 6 mm) menjadi 2,9% (pada resipien 3 mm). Kemampuan teknis dalam metode mikroinjeksi sendiri memiliki peran penting terhadap keberhasilan masuknya sel donor ke dalam rongga perut resipien. Selain itu penguasaan teknis penyuntikan secara tidak langsung juga dapat memengaruhi tingkat kelangsungan hidup resipien pada saat penyuntikan dilakukan. Menurut Ath-thar et al. (2008) dengan menggunakan teknik mikroinjeksi pada embrio memungkinkan adanya teknis injeksi yang membuat rusaknya jaringan tertentu sehingga menyebabkan telur tidak dapat menetas setelah dilakukan penyuntikan.

Tabel 2. *Survival rate* (SR) larva hingga tujuh hari setelah penyuntikan.

No	Umur resipien saat penyuntikan sel donor	<i>Survival Rate</i> (%)
1	Kontrol (tanpa penyuntikan)	100
2	Hari Ke 1-2	89,34
3	Hari Ke 3-4	98,96

Analisis PCR Gonad Resipien

Konfirmasi kolonisasi sel donor pada gonad resipien umur dua bulan setelah transplantasi dilakukan karena gonad ikan nila yang berumur $\pm$ dua bulan telah berkembang dan jika dilakukan pembedahan, gonad sudah terlihat secara jelas dan mudah diambil serta dipisahkan dari organ lainnya untuk diekstraksi DNA-nya. Waktu $\pm$ dua bulan diduga merupakan waktu yang tepat untuk menentukan apakah sel donor dapat berkembang atau tidak di dalam gonad ikan resipien. Seperti yang telah diketahui sebelumnya bahwa tingkat kolonisasi atau perkembangan sel donor pada resipien (ikan *rainbow trout*) sudah dapat ditentukan dan dideteksi pada waktu sepuluh hari setelah dilakukan penyunti-

kan (proses transplantasi) (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003). Dengan mengacu hasil penelitian Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi (2003), maka pemeriksaan gonad resipien (ikan nila) dalam rangka untuk mengetahui perkembangan sel donor pada penelitian ini masih layak dilakukan pada resipien berumur dua bulan setelah transplantasi.

Proses kolonisasi (penggabungan) sel donor ke gonad resipien diawali dengan proses migrasi sel donor ke jaringan bakal gonad (*genital ridge*) dari ikan resipien. Menurut Yoshizaki et al. (2010) proses migrasi *primordial germ cell* (PGC) diawali disekresikannya *chemokine stromal derived factor-1* (SDF-1) oleh sel somatik bakal gonad resipien, PGC (sel donor) tersebut kemudian mengekspresikan reseptor *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR-4) dan bermigrasi ke bakal gonad menggunakan pseudopodia. Apabila telah mencapai daerah bakal gonad, PGC mengalami penggabungan (terkolonisasi) dengan gonad resipien.

Berdasarkan deteksi sel gonad resipien dengan menggunakan teknik PCR tersebut dapat dikatakan bahwa keberhasilan kolonisasi dengan melakukan penyuntikan terhadap resipien berumur 1-2 hari setelah menetas adalah 100% (Gambar 3). Keberhasilan ini diduga karena *rejection immune system* resipien belum berkembang dengan sempurna sehingga resipien masih mampu menerima sel donor dari luar yang dimasukkan ke dalam rongga peritonealnya. Seperti dinyatakan oleh Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi (2003) bahwa sel donor tidak terkolonisasi di dalam tubuh resipien ketika resipien (*rainbow trout*) yang digunakan telah berumur 45 hari setelah fertilisasi. Hal ini diduga oleh adanya kemampuan ikan menolak adanya sel asing dari luar. Pada beberapa spesies ikan yang baru menetas sistem imun masih relatif belum berkembang baik (Manning

and Nakanishi 1996). Dengan demikian sel donor masih dapat berkembang di dalam tubuh resipien. Sebagai contoh ikan yang sudah dapat menolak sel donor pada umur tertentu adalah ikan mas umur 16 hari setelah menetas pada suhu 20-22°C, *Xiphophorus maculatus* 23 hari setelah fertilisasi pada suhu 20°C dan pada *rainbow trout* 14 hari setelah menetas pada suhu 14°C (Nakanishi 1986).

Berbeda dengan hasil PCR terhadap resipien yang disuntik pada umur 1-2 hari setelah menetas. Hasil deteksi terhadap

Gambar 3. A) Analisis PCR DNA sampel resipien (yang disuntik pada umur 1-2 hari setelah menetas) dua bulan setelah penyuntikan menggunakan marka molekular spesifik GH-Gurame. M, marker; (-), kontrol negatif bahan PCR, N, DNA ikan nila; G, DNA ikan gurame; a-f, DNA sampel resipien yang berumur dua bulan setelah penyuntikan. B) PCR menggunakan primer Ti β -aktin sebagai kontrol internal.

nya yang menggunakan PGC ikan donor (*rainbow trout*) (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003).

Pada penelitian yang menggunakan PGC dari umur embrio donor yang sama, kemudian ditransplantasikan ke resipien dengan umur berbeda (35, 40, dan 45 *days post fertilization*, (dpf)) menunjukkan adanya penurunan tingkat kolonisasi yang signifikan terhadap sel donor pada resipien umur 45-dpf pada waktu 30 hari setelah transplantasi. Hal ini diduga bahwa umur resipien memiliki pengaruh penting dalam memberikan lingkungan di dalam peritoneal (*micro-environment*) yang mampu mengarahkan migrasi sel donor ke

larva resipien yang disuntik pada umur 3-4 hari menunjukkan adanya resipien yang tidak membawa sel donor (sampel ke-4) dalam gonadnya (Gambar 4), diduga bahwa sistem *immune rejection* sudah mulai berkembang pada hari ke-3 setelah menetas. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel donor gagal berkembang dan terkolonisasi di dalam gonad resipien. Dengan demikian keberhasilan kolonisasi hanya mencapai 75% dari empat sampel yang diperiksa gonadnya. Kasus yang sama juga terjadi terhadap hasil penelitian lain-

Gambar 4. A) Analisis PCR DNA sampel resipien (yang disuntik pada umur 3-4 hari setelah menetas) dua bulan setelah penyuntikan menggunakan marka molekular spesifik GH-Gurame. M, marker; 1-4, DNA sampel resipien yang berumur dua bulan setelah penyuntikan; G, DNA ikan gurame; N, DNA ikan nila; (-), kontrol negatif bahan PCR. B) PCR menggunakan primer Ti β -aktin sebagai kontrol internal.

genital ridge-nya sehingga sel donor dapat terkolonisasi. Seperti yang dijelaskan oleh Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi (2003) bahwa hilangnya kondisi lingkungan di dalam *peritoneal cavity* resipien ikan *rainbow trout* yang mampu mengarahkan PGC donor hasil transplantasi bermigrasi ke *genital ridge*-nya ketika resipien berumur antara 40 dan 45 dpf. Selain itu beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan dari transplantasi adalah hubungan genetik, respon lingkungan mikro di dalam resipien seperti keberadaan sel sertoli (Doitsidou et al. 2002; Yazawa et al. 2010). Dilaporkan oleh Takeuchi et al. (2009) donor type A *spermatogonia* (type A SG Keberhasilan

transplantasi berdasarkan tingkat kolonisasi ini termasuk kategori relatif tinggi jika dibandingkan dengan hasil transplantasi ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) (Okutsu et al. 2006). Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan karakterisasi sperma dan telur fungsional ikan transplan untuk mengetahui perkembangan sperma dan telur ikan donor pada ikan resipien sampai dengan potensi menghasilkan keturunan yang diharapkan.

KESIMPULAN

Transplantasi sel testikular ikan gurame pada larva ikan nila awal menetas telah berhasil dilakukan. Resipien umur 1-2 hari memiliki tingkat keberhasilan yang lebih baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Endang Tri Margawati dan Dr. Odang Carman sebagai pembimbing selama penyusunan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Alimuddin atas bimbingan selama penelitian, penyusunan karya tulis dan sekaligus membantu pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Achmad, Marlina. 2009. "Pengembangan Marka Molekuler DNA dalam Identifikasi Sel Gonad Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) dan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Menggunakan PCR." Institut Pertanian Bogor.

Alimuddin, M. Zairin Jr., dan Harton Arfah. 2009. Teknologi Transplantasi Sel Testikular dalam Rekayasa Produksi Benih Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*). Laporan hasil Penelitian Strategis Internasional IPB.

Ath-thar, MH. Fariduddin, Komar Sumatadinata, Alimuddin, dan Rudhy Gustiano. 2008. "Efektivitas Promoter β -Actin Ikan Medaka *Oryzias Latipes* dengan Penanda Gen hrGFP (Humanized Renilla Reniformis Green Fluorescent Protein) pada Ikan Lele *Clarias Gariepinus* Keturunan F0." *Jurnal Riset Akuakultur* 3(2): 199–207.

Brinster, Ralph L., and James W. Zimmermann. 1994. "Spermatogenesis Following Male Germ Cell Transplantation." *In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:11298–302.

Doitsidou, Maria, Michal Reichman-fried, Jurg Stebler, Marion Kopranner, Julia Dorries, Dirk Meyer, Camila V. Esguerra, Tin Chung Leung, and Erez Raz. 2002. "Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1." *Cell* 111: 647–59.

Gustiano, Rudhy. 2009. "Ikan Nila BEST ; Unggulan Baru, Harapan Mutu." *Trobos*.

Kobayashi, Terumasa, Goro Yoshizaki, Yutaka Takeuchi, and Toshio Takeuchi. 2004. "Isolation of Highly Pure and Viable Primordial Germ Cells from Rainbow Trout by GFP-Dependent Flow Cytometry." *Molecular Reproduction and Development* 67(1): 91–100. doi:10.1002/mrd.20003.

Majhi, Sullip K, Ricardo S Hattori, Masashi Yokota, Seiichi Watanabe, and Carlos A Strüssmann. 2009. "Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germ lines." *PloS One* 4(7): e6132. doi:10.1371/journal.pone.0006132.

Manning, Margaret J., and Teruyuki Nakanishi. 1996. "The Specific Immune System : Cellular Defenses." *In The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*, edited by George Iwama and

- Teruyuki Nakanishi, 159–205. New York: Academic Press, Inc.
- Mauluddin. 2009. “Studi Mengenai Morfologi dan Komposisi Sel Testikular Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*, Lac.)” Institut Pertanian Bogor.
- Nakanishi, Teruyuki. 1986. “Ontogenetic Development of the Immune Response in the Marine.” *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, August.
- Okutsu, Tomoyuki, Kensuke Suzuki, Yutaka Takeuchi, Toshio Takeuchi, and Goro Yoshizaki. 2006. “Testicular Germ Cells Can Colonize Sexually Undifferentiated Embryonic Gonad and Produce Functional Eggs in Fish.” In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:2725–29. doi:10.1073/pnas.0509218103.
- SNI. 2000. *Induk Ikan Gurame (Osphronemus gouramy, Lac) Kelas Induk Pokok (Parent Stock)*. Indonesia.
- . 2009. *Produksi Ikan Nila (Oreochromis niloticus bleeker) Kelas Pembesaran di Kolam Air Tenang*. Indonesia.
- Takeuchi, Yutaka, Kentaro Higuchi, Takashi Yatabe, Misako Miwa, and Goro Yoshizaki. 2009. “Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, Nibea Mitsukurii (Perciformes, Sciaenidae).” *Biology of Reproduction* 1063: 1055–63. doi:10.1095/biolreprod.109.077701.
- Takeuchi, Yutaka, Goro Yoshizaki, and Toshio Takeuchi. 2003. “Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout.” *Biology of Reproduction* 69: 1142–49. doi:10.1095/biolreprod.103.017624.
- . 2004. “Surrogate Broodstock Produces Salmonids.” *Nature* 430: 629–30. www.nature.com/nature.
- Yazawa, Ryosuke, Yutaka Takeuchi, Kentaro Higuchi, Takashi Yatabe, Naoki Kabeya, and Goro Yoshizaki. 2010. “Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells.” *Biology of Reproduction* 82(5): 896–904. doi:10.1095/biolreprod.109.081281.
- Yoshizaki, G, T Okutsu, M Ichikawa, M Hayashi, and Y Takeuchi. 2010. “Sexual Plasticity of Rainbow Trout Germ Cells.” *Animal Reproduction* 7(3): 187–96.

PENDAHULUAN

Teknologi transplantasi adalah bagian dari bioteknologi yang saat ini banyak berkembang di mamalia. Transplantasi sel merupakan pemindahan sel donor ke resipien yang bertujuan untuk perekayasaan atau perbaikan fungsi organ pada resipien, misalnya untuk rekayasa produktivitas organ reproduksi. Pengembangan teknologi tersebut yang kemudian menjadi inspirasi penerapannya pada penelitian di bidang perikanan. Teknologi transplantasi sel germinal merupakan teknik yang dikembangkan pertama kali pada ayam, kemudian transplantasi sel spermatogonia pada mamalia (Brinster and Zimmermann 1994). Teknologi yang sama juga telah dikembangkan di bidang teknologi perikanan (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003; Okutsu et al. 2006; dan Yoshizaki et al. 2010). Dengan teknologi tersebut ikan *rainbow trout* (donor) dapat dihasilkan dengan cara mengawinkan ikan salmon masu yang telah ditransplantasi. Walaupun demikian penelitian transplantasi pada ikan air tawar belum banyak dilakukan. Padahal keberhasilannya sangat membantu dalam peningkatan produktivitas dan nilai ekonomisnya. Hal ini diduga disebabkan adanya anggapan bahwa teknologi reproduksi konvensional masih dirasa cukup menguntungkan dan relatif murah di samping karena minimnya referensi teknologi ini pada ikan air tawar. Keberhasilan teknologi transplantasi tidak hanya terjadi pada jenis donor dan resipien yang dekat hubungan filogeninya (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2004) tetapi juga memberikan harapan terhadap objek yang jauh hubungan filogeninya (Yazawa et al. 2010; Majhi et al. 2009). Dengan demikian sangat memungkinkan teknologi ini untuk diaplikasikan pada jenis ikan air tawar yang bernilai ekonomi seperti nila, gurame, patin, lele, dan lain-lain.

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) yang merupakan ikan bernilai ekonomi penting bagi pembudidaya ikan air tawar khususnya di Indonesia adalah jenis ikan yang memiliki umur matang gonad siap memijah relatif lama sekitar 30-36 bulan (SNI 2000) dan kekhasan rasanya membuat alasan favorit bagi konsumennya. Sebagai salah satu upaya peningkatan produktivitasnya diperlukan rekayasa reproduksi yang memerlukan induk pengganti, khususnya pada ikan yang lebih cepat matang gonad, seperti ikan nila. Teknologi transplantasi sel testikular ini sangat berpotensi jika diterapkan dengan menggunakan ikan nila sebagai induk pengganti (*surrogate broodstock*) dan ikan gurame sebagai donor.

Selain kekerabatan atau hubungan filogeni, umur resipien saat transplantasi juga menjadi salah satu faktor penentu keberhasilan transplantasi sel. Hal ini berkaitan dengan efisiensi kolonisasi dan adanya sistem imun resipien (Manning and Nakanishi 1996). Untuk mengetahui keberhasilan transplantasi sel pada ikan nila diperlukan kajian tentang faktor-faktor penentu tersebut. Oleh karena itu perlu adanya studi mengenai efektivitas keberhasilan transplantasi pada larva ikan nila dilihat dari umur larva setelah menetas. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji keberhasilan transplantasi sel testikular ikan gurame ke larva ikan nila dengan umur berbeda melalui kolonisasi sel donor.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Ikan resipien

Induk ikan nila yang digunakan dalam penelitian ini adalah *strain* nila *Bogor Enhanced Strain Tilapia* (BEST) (Gustiano 2009) yang diperoleh dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar,

Bogor. Bobot induk ikan nila yang digunakan adalah 350-500 g yang dipelihara dalam akuarium berdimensi 60x50x50 cm³ dan berisi air sebanyak $\frac{3}{4}$ bagian dari volume total akuarium. Aerasi diberikan sebagai suplai oksigen untuk kebutuhan ikan nila lebih dari 3 ppm (SNI 2009). Setiap akuarium diisi satu induk ikan untuk mencegah terjadinya kontak fisik antar-ikan dan untuk memudahkan dalam pemijahan. Pakan (protein 35-40%) diberikan selama masa pemeliharaan 3-5 kali pada setiap harinya, agar nutrisi induk terpenuhi dengan baik dan untuk menjaga kualitas telur dan spermanya. Air disifon setiap hari dan diganti setiap tiga hari untuk menjaga kualitas air.

Ikan donor

Ikan gurame jantan dengan bobot 600-900 g/ekor diperoleh dari wilayah Kayumanis, Bogor, Jawa Barat. Sebelum diambil gonadnya untuk transplantasi, ikan gurame dipelihara di hapa ukuran 3x1,5x1 m³ pada kolam pemeliharaan dan diberi pakan daun sente (*Alocasia macrorrhiza*) hingga ikan digunakan sebagai donor sel testikular.

Persiapan Resipien untuk Transplantasi

Induk ikan nila dipijahkan dengan perbandingan jantan dan betina 1:1, kemudian telur dan sperma dikeluarkan dengan cara mengurut bagian perut (*stripping*) ke arah urogenital. Larutan NaCl 0,9% diberikan untuk menjaga kualitas telur sebelum dilakukan fertilisasi.

Sebanyak 150 butir telur dicampurkan dengan sperma sebanyak 0,15-0,2 ml (tanpa pengenceran) ke dalam cawan petri dan ditambahkan larutan fisiologis (NaCl 0,9%). Digunakan bulu ayam untuk mencampur telur dan sperma. Air ditambahkan ke dalam cawan petri berisi sperma dan telur, dan waktu pencampuran tersebut dihitung sebagai waktu fertilisasi yang kemudian diinkubasi dalam akuarium untuk proses penetasan. Larva hasil penetasan tersebut

dipelihara dalam wadah yang sama sampai dilakukan proses transplantasi.

Penyediaan sel donor untuk transplantasi

Transplantasi diawali dengan penyiapan sel gonad ikan donor (ikan gurame jantan) melalui proses disosiasi. Ikan donor dibedah untuk diambil gonadnya dan dibersihkan dari lemak dan jaringan lain yang menempel. Gonad dipotong-potong menjadi ukuran sekitar 5 mm di dalam cawan petri dan dicacah selama 3-5 menit. Sebanyak 1-2 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang mengandung tripsin 0,5% ditambahkan, kemudian dicacah kembali 3-5 menit sampai keruh. Cacahan tersebut dipipet-teteskan (*pipetting*) menggunakan mikropipet sampai berbuih membentuk suspensi sel. Suspensi sel tersebut disaring dengan saringan 60 µm dan dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama sepuluh menit sampai sel mengendap. Supernatan dibuang dan diganti dengan PBS sebanyak 200-400 µl untuk menjaga sel agar tidak rusak dan memutus kerja dari tripsin. Suspensi sel dihomogenasi dan dihitung kepadatannya menggunakan hemositometer. Kepadatan sel diatur menjadi 20.000 sel/0,5 µl atau 40.000 sel/µl PBS sesuai dengan kebutuhan untuk transplantasi.

Transplantasi

Jarum mikroinjeksi dipasang pada *needle holder* dan diisi dengan minyak mineral yang terdapat pada alat micromanipulator yang terpasang dengan mikroskop “Stemi DV4, Zeiss”. Larva ikan nila umur 1-2 hari, umur 3-4 hari setelah penetasan diinjeksi sebanyak ± 20.000 sel. Larva hasil penyuntikan dipelihara sampai umur sekitar dua bulan di dalam akuarium 60x50x50 cm³. Ikan hasil penyuntikan diberikan pakan berupa cacing sutra selama dua minggu secara *ad satiation*. Selama pemeliharaan diberi pakan pellet F999 protein 38% secara *ad satiation*. Air disifon satu

kali dalam sehari dan diganti 80% setiap tiga hari. Kelangsungan hidup (SR) larva diamati sampai hari ke-7 setelah penyuntikan untuk mengetahui tingkat ketahanan larva terhadap penyuntikan.

Analisis PCR

Konfirmasi keberhasilan dari penyuntikan (mikroinjeksi sel testikular donor pada resipien) menggunakan analisis *polymerase chain reaction* (PCR). Ikan diambil secara acak dari populasi, DNA diekstraksi dari ikan resipien umur satu hari setelah penyuntikan menggunakan kit isolasi DNA (Gentra, Minneapollis-USA) dengan prosedur seperti dalam manual. DNA campuran (resipien dan donor) disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dilakukan proses PCR. Analisis kemurnian DNA hasil ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan GeneQuant. Sedangkan tingkat kolonisasi sel donor pada gonad resipien dapat diketahui dengan analisis PCR pada gonad ikan resipien dua bulan setelah penyuntikan.

PCR dilakukan menggunakan primer *Growth hormone* (GH) ikan gurame, yaitu F1GH (5'-TGTTCTCTGACGG-CGTGGTT-3') dan R1GH (5'-GCAACAAAAACCACCAGAAAGAG-3') dengan program seperti berikut. Pre-denaturasi 93 °C selama tiga menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 45 detik, dan final ekstensi 72 °C selama tiga menit, sebanyak 45 siklus (Achmad 2009). PCR untuk kontrol *internal loading* DNA dilakukan dengan menggunakan primer tiβ-aktin (F: 5'-GTGCCCATCTACGAGGGTTA-3' R :

5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3') Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa 1% dan visualisasi DNA menggunakan sinar UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Disosiasi Sel Testikular Ikan Donor

Ikan gurame pada penelitian ini memperlihatkan hasil yang berbeda antar-individu. Jumlah spermatogonia pada donor 827 g sebanyak 6.300.000 sel (4,45%) sedangkan pada donor 608 g sebanyak 4.000.000 sel (14,98%) (Tabel 1). Hal ini juga berpengaruh terhadap persentase spermatogonia pada setiap donor, yaitu donor pertama dengan bobot tubuh yang lebih tinggi memiliki persentase spermatogonia yang lebih rendah (4,54%) dibandingkan dengan donor kedua (14,98%). Semakin tinggi bobot tubuh ikan gurame, maka semakin rendah persentase spermatogonia yang terkandung dalam gonadnya (Alimuddin, M. Zairin Jr., and Arfah 2009).

Gambar 1. Sel testikular ikan donor hasil disosiasi menggunakan PBS yang mengandung tripsin 0,5%. Spermatozoa ditunjukkan oleh anak panah.

Sel donor khususnya sel spermatogonia dalam bentuk tunggal (terpisah dari jaringan gonad dan sel germinal lainnya) yang *viable* (hidup) dan berpotensi

Tabel 1. Hasil disosiasi sel gonad ikan donor, gurame

Donor	Bobot tubuh (g)	Bobot gonad (g)	Σ sel testikular (sel)	Jumlah spermatogonia (sel)	Persentase spermatogonia (%)
1	827	0,1513	138.625.000	6.300.000	4,54
2	608	0,1169	26.704.000	4.000.000	14,98

untuk berkembang ataupun berdiferensiasi di dalam gonad resipien dapat diperoleh dengan cara disosiasi sel (pemisahan sel dari jaringan). Menurut Kobayashi et al. (2004), selain tingkat kemurnian sel donor, viabilitasnya juga dapat memengaruhi kemampuan diferensiasi menjadi sel germinal pada resipien. Pada penelitian ini telah berhasil diperoleh sel testikular hasil disosiasi gonad ikan donor menggunakan tripsin 0,5% di dalam larutan PBS. Disosiasi sel menggunakan *trypsin-phosphate buffer saline* (Trip-PBS) 0,5% dengan lama inkubasi kurang dari atau selama dua jam diperoleh suspensi sel testikular ikan gurame dengan viabilitas 96,77-100% (Alimuddin, M. Zairin Jr., and Arfah 2009). Berdasarkan kriteria ukuran sel spermatogonia ikan gurame (5-15 μm) (Mauluddin 2009), jumlah dan persentase sel spermatogonia hasil disosiasi sel testikular dapat dilihat pada Gambar 1.

Analisis PCR pada DNA Resipien satu Hari Setelah Penyuntikan

Lima sampel (lane 1-5) yang diperiksa dengan PCR menggunakan marka molekuler spesifik GH-gurame memperlihatkan pita DNA sesuai dengan pita kontrol positif DNA ikan gurame (G) berukuran 340 pb (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa penyuntikan sel donor telah berhasil masuk ke rongga perut ikan resipien. Teknik PCR menggunakan primer spesifik tersebut telah diuji tingkat sensitivitas dan spesifitasnya (Achmad 2009). Teknik PCR ini mampu mendeteksi DNA ikan gurame dengan konsentrasi 1 ng/ μl di dalam 700 ng/ μl DNA ikan nila. Apabila konsentrasi DNA tersebut dikonversi ke dalam jumlah sel melalui analisis ekstraksi DNA menunjukkan bahwa teknik PCR tersebut mampu mendeteksi satu sel ikan gurame yang terdapat di dalam 10.000 sel ikan nila (Achmad 2009) atau dengan kata lain bahwa teknik PCR ini memiliki sensitivitas

yang cukup tinggi. Dengan demikian nilai rasio jumlah sel donor yang disuntikkan ke resipien (larva) diperkirakan lebih dari sama dengan satu berbanding 10.000 sel resipien.

Gambar 2. A) Analisis PCR DNA larva 1 hari setelah penyuntikan sel donor menggunakan marka molekuler spesifik GH-Gurame (konfirmasi keberhasilan penyuntikan). M, marker; 1-5, DNA sampel larva; G, DNA ikan gurame sebagai kontrol positif; N, DNA ikan nila sebagai kontrol negatif; (-) Kontrol bahan pada proses PCR. B) PCR menggunakan primer Ti β -actin sebagai kontrol internal.

Tingkat Kelangsungan Hidup Resipien

Tingkat kelangsungan hidup resipien tujuh hari setelah penyuntikan menunjukkan kecenderungan peningkatan seiring dengan semakin meningkatnya umur resipien pada saat penyuntikan dilakukan (Tabel 2). Terlihat bahwa tingkat kelangsungan hidup (*Survival Rate*) larva paling tinggi adalah kontrol, kemudian diikuti dengan perlakuan penyuntikan pada larva umur 3-4 hari (98,96%) dan paling rendah adalah perlakuan penyuntikan pada larva umur 1-2 hari (89,34%) (Tabel. 2). Diduga umur larva yang masih muda memiliki daya tahan tubuh lemah dan rentan terhadap gangguan fisik dari luar yang berupa teknis penyuntikan. Teknis penyuntikan ini berisiko mengenai organ lain yang dapat menyebabkan kerusakan organ sehingga larva mudah mati ketika selesai disuntik. Takeuchi et al. (2009) menyatakan bahwa *donor type*

A spermatogonia (type A SG), bahwa resipien yang lebih kecil memiliki tingkat kelangsungan hidup yang lebih kecil juga. Keadaan ini diperlihatkan dengan menurunnya SR larva dari 63,3% (pada resipien ikan nila, larva ukuran 6 mm) menjadi 2,9% (pada resipien 3 mm). Kemampuan teknis dalam metode mikroinjeksi sendiri memiliki peran penting terhadap keberhasilan masuknya sel donor ke dalam rongga perut resipien. Selain itu penguasaan teknis penyuntikan secara tidak langsung juga dapat memengaruhi tingkat kelangsungan hidup resipien pada saat penyuntikan dilakukan. Menurut Ath-thar et al. (2008), dengan menggunakan teknik mikro injeksi pada embrio memungkinkan adanya teknis injeksi yang membuat rusaknya jaringan tertentu sehingga menyebabkan telur tidak dapat menetas setelah dilakukan penyuntikan.

Tabel 2. *Survival rate* (SR) larva hingga tujuh hari setelah penyuntikan.

No.	Umur resipien saat penyuntikan sel donor	<i>Survival Rate</i> (%)
1	Kontrol (tanpa penyuntikan)	100
2	Hari Ke 1-2	89,34
3	Hari Ke 3-4	98,96

Analisis PCR Gonad Resipien

Konfirmasi kolonisasi sel donor pada gonad resipien umur dua bulan setelah transplantasi dilakukan karena gonad ikan nila yang berumur $\pm$ dua bulan telah berkembang dan jika dilakukan pembedahan, gonad sudah terlihat secara jelas dan mudah diambil serta dipisahkan dari organ lainnya untuk diekstraksi DNA-nya. Waktu $\pm$ dua bulan diduga merupakan waktu yang tepat untuk menentukan apakah sel donor dapat berkembang atau tidak di dalam gonad ikan resipien. Seperti yang telah diketahui sebelumnya bahwa tingkat kolonisasi atau perkembangan sel donor

pada resipien (ikan *rainbow trout*) sudah dapat ditentukan dan dideteksi pada waktu sepuluh hari setelah dilakukan penyuntikan (proses transplantasi) (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003). Dengan mengacu hasil penelitian Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi (2003), maka pemeriksaan gonad resipien (ikan nila) dalam rangka untuk mengetahui perkembangan sel donor pada penelitian ini masih layak dilakukan pada resipien berumur dua bulan setelah transplantasi.

Proses kolonisasi (penggabungan) sel donor ke gonad resipien diawali dengan proses migrasi sel donor ke jaringan bakal gonad (*genital ridge*) dari ikan resipien. Menurut Yoshizaki et al. (2010) proses migrasi *primordial germ cell* (PGC) diawali disekresikannya *chemokine stromal derived factor-1* (SDF-1) oleh sel somatik bakal gonad resipien, PGC (sel donor) tersebut kemudian mengekspresikan reseptor *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR-4) dan bermigrasi ke bakal gonad menggunakan pseudopodia. Apabila telah mencapai daerah bakal gonad, PGC mengalami penggabungan (terkolonisasi) dengan gonad resipien.

Berdasarkan deteksi sel gonad resipien dengan menggunakan teknik PCR tersebut dapat dikatakan bahwa keberhasilan kolonisasi dengan melakukan penyuntikan terhadap resipien berumur 1-2 hari setelah menetas adalah 100% (Gambar 3). Keberhasilan ini diduga karena *rejection immune system* resipien belum berkembang dengan sempurna sehingga resipien masih mampu menerima sel donor dari luar yang dimasukkan ke dalam rongga peritonealnya. Seperti dinyatakan oleh Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi (2003) bahwa sel donor tidak terkolonisasi di dalam tubuh resipien ketika resipien (*rainbow trout*) yang digunakan telah berumur 45 hari setelah fertilisasi. Hal ini diduga oleh adanya kemampuan ikan menolak adanya

sel asing dari luar. Pada beberapa spesies ikan yang baru menetas sistem imun masih relatif belum berkembang baik (Manning and Nakanishi 1996). Dengan demikian sel donor masih dapat berkembang di dalam tubuh resipien. Sebagai contoh ikan yang sudah dapat menolak sel donor pada umur tertentu adalah ikan mas umur 16 hari setelah menetas pada suhu 20-22 °C, *Xiphophorus maculatus* 23 hari setelah fertilisasi pada suhu 20 °C dan pada *rainbow trout* 14 hari setelah menetas pada suhu 14 °C (Nakanishi 1986).

Berbeda dengan hasil PCR terhadap resipien yang disuntik pada umur 1-2 hari setelah menetas. Hasil deteksi terhadap larva resipien yang disuntik pada umur 3-4 hari menunjukkan adanya resipien yang tidak membawa sel donor (sampel ke-4) dalam gonadnya (Gambar 4), diduga bahwa sistem *immune rejection* sudah mulai berkembang pada hari ke-3 setelah menetas. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel donor gagal berkembang dan terkolonisasi di dalam gonad resipien. Dengan demikian keberhasilan kolonisasi hanya mencapai 75% dari empat sampel yang diperiksa gonadnya. Kasus yang sama juga terjadi terhadap hasil penelitian lain-

nya yang menggunakan PGC ikan donor (*rainbow trout*) (Takeuchi, Yoshizaki, and Takeuchi 2003).

Pada penelitian yang menggunakan PGC dari umur embrio donor yang sama, kemudian ditransplantasikan ke resipien dengan umur berbeda (35, 40, dan 45 *days post fertilization*, (dpf)) menunjukkan adanya penurunan tingkat kolonisasi yang signifikan terhadap sel donor pada resipien umur 45 dpf pada waktu 30 hari setelah transplantasi. Hal ini diduga bahwa umur resipien memiliki pengaruh penting dalam memberikan lingkungan di dalam peritoneal (*micro-environment*) yang mampu mengarahkan migrasi sel donor ke *genital ridge*-nya sehingga sel donor dapat terkolonisasi. Seperti yang dijelaskan oleh Takeuchi, Yoshizaki, dan Takeuchi (2003), bahwa hilangnya kondisi lingkungan di dalam *peritoneal cavity* resipien ikan *rainbow trout* mampu mengarahkan PGC donor hasil transplantasi bermigrasi ke *genital ridge*-nya ketika resipien berumur antara 40 dan 45 dpf. Selain itu beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan dari transplantasi adalah hubungan genetik, dan respon lingkungan mikro di dalam resipien, seperti keberadaan sel

Gambar 3. A) Analisis PCR DNA sampel resipien (yang disuntik pada umur 1-2 hari setelah menetas) dua bulan setelah penyuntikan menggunakan marka molekular spesifik GH-Gurame. M, marker; (-), kontrol negatif bahan PCR, N, DNA ikan nila; G, DNA ikan gurame; a-f, DNA sampel resipien yang berumur dua bulan setelah penyuntikan. B) PCR menggunakan primer Ti β -aktin sebagai kontrol internal.

Gambar 4. A) Analisis PCR DNA sampel resipien (yang disuntik pada umur 3-4 hari setelah menetas) dua bulan setelah penyuntikan menggunakan marka molekular spesifik GH-Gurame. M, marker; 1-4, DNA sampel resipien yang berumur dua bulan setelah penyuntikan; G, DNA ikan gurame; N, DNA ikan nila; (-), kontrol negatif bahan PCR. B) PCR menggunakan primer Ti β -aktin sebagai kontrol internal.

sertoli (Doitsidou et al. 2002; Yazawa et al. 2010). Dilaporkan oleh Takeuchi et al. (2009) pada donor type A *spermatogonia* (type A SG) keberhasilan transplantasi berdasarkan tingkat kolonisasi ini termasuk kategori relatif tinggi jika dibandingkan dengan hasil transplantasi ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*) (Okutsu et al. 2006). Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan karakterisasi sperma dan telur fungsional ikan transplan untuk mengetahui perkembangan sperma dan telur ikan donor pada ikan resipien sampai dengan potensi menghasilkan keturunan yang diharapkan.

KESIMPULAN

Transplantasi sel testikular ikan gurame pada larva ikan nila awal menetas telah berhasil dilakukan. Resipien umur 1-2 hari memiliki tingkat keberhasilan yang lebih baik daripada resipien umur 3-4 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Endang Tri Margawati dan Dr. Odang Carman sebagai pembimbing selama penyusunan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Alimuddin atas bimbingan selama penelitian, penyusunan karya tulis, dan sekaligus membantu pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

Achmad, Marlina. 2009. "Pengembangan Marka Molekuler DNA dalam Identifikasi Sel Gonad Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*) dan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Menggunakan PCR." Institut Pertanian Bogor.

Alimuddin, M. Zairin Jr., dan Harton Arfah. 2009. Teknologi Transplantasi Sel Testikular dalam Rekayasa Produksi Benih Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*). Laporan Hasil Penelitian Strategis Internasional IPB.

Ath-thar, MH. Fariduddin, Komar Sumatadinata, Alimuddin, dan Rudhy Gustiano. 2008. "Efektivitas Promoter β -Actin Ikan Medaka *Oryzias latipes* dengan Penanda Gen hrGFP (Humanized Renilla Reniformis Green Fluorescent Protein) pada Ikan Lele *Clarias Gariepinus* Keturunan F0." *Jurnal Riset Akuakultur* 3 (2): 199–207.

Brinster, Ralph L., and James W. Zimmermann. 1994. "Spermatogenesis Following Male Germ Cell Transplantation." *In Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:11298–302.

Doitsidou, Maria, Michal Reichman-fried, Jurg Stebler, Marion Kopranner, Julia Dorries, Dirk Meyer, Camila V. Esguerra, Tin Chung Leung, and Erez Raz. 2002. "Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1." *Cell* 111: 647–59.

Gustiano, Rudhy. 2009. "Ikan Nila BEST ; Unggulan Baru, Harapan Mutu." *Trobos*.

Kobayashi, Terumasa, Goro Yoshizaki, Yutaka Takeuchi, and Toshio Takeuchi. 2004. "Isolation of Highly Pure and Viable Primordial Germ Cells from Rainbow Trout by GFP-Dependent Flow Cytometry." *Molecular Reproduction and Development* 67 (1): 91–100. doi:10.1002/mrd.20003.

Majhi, Sullip K, Ricardo S Hattori, Masashi Yokota, Seiichi Watanabe, and Carlos A Strüssmann. 2009. "Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germ lines." *PloS One* 4 (7): e6132. doi:10.1371/journal.pone.0006132.

- Manning, Margaret J., and Teruyuki Nakanishi. 1996. "The Specific Immune System : Cellular Defenses." In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*, edited by George Iwama and Teruyuki Nakanishi, 159–205. New York: Academic Press, Inc.
- Mauluddin. 2009. "Studi Mengenai Morfologi dan Komposisi Sel Testikular Ikan Gurame (*Osphronemus gouramy*, Lac.)" Institut Pertanian Bogor.
- Nakanishi, Teruyuki. 1986. "Ontogenetic Development of the Immune Response in the Marine." *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, August.
- Okutsu, Tomoyuki, Kensuke Suzuki, Yutaka Takeuchi, Toshio Takeuchi, and Goro Yoshizaki. 2006. "Testicular Germ Cells Can Colonize Sexually Undifferentiated Embryonic Gonad and Produce Functional Eggs in Fish." In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:2725–29. doi:10.1073/pnas.0509218103.
- SNI. 2000. *Induk Ikan Gurame (Osphronemus gouramy, Lac)* Kelas Induk Pokok (Parent Stock). Indonesia.
- . 2009. *Produksi Ikan Nila (Oreochromis niloticus bleeker)* Kelas Pembesaran di Kolam Air Tenang. Indonesia.
- Takeuchi, Yutaka, Kentaro Higuchi, Takashi Yatabe, Misako Miwa, and Goro Yoshizaki. 2009. "Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, Nibea Mitsukurii (Perciformes, Sciaenidae)." *Biology of Reproduction* 1063: 1055–63. doi:10.1095/biolreprod.109.077701.
- Takeuchi, Yutaka, Goro Yoshizaki, and Toshio Takeuchi. 2003. "Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout." *Biology of Reproduction* 69: 1142–49. doi:10.1095/biolreprod.103.017624.
- . 2004. "Surrogate Broodstock Produces Salmonids." *Nature* 430: 629–30. www.nature.com/nature.
- Yazawa, Ryosuke, Yutaka Takeuchi, Kentaro Higuchi, Takashi Yatabe, Naoki Kabeya, and Goro Yoshizaki. 2010. "Chub Mackerel Gonads Support Colonization, Survival, and Proliferation of Intraperitoneally Transplanted Xenogenic Germ Cells." *Biology of Reproduction* 82 (5): 896–904. doi:10.1095/biolreprod.109.081281.
- Yoshizaki, G, T Okutsu, M Ichikawa, M Hayashi, and Y Takeuchi. 2010. "Sexual Plasticity of Rainbow Trout Germ Cells." *Animal Reproduction* 7 (3): 187–96.