

## Efektivitas promotor $\beta$ -aktin dalam mengarahkan ekspresi gen target pada transgenesis ikan mas

### Effectiveness of $\beta$ -actin promoter on driving target gene expression in common carp transgenesis

Andi Aliah Hidayani<sup>1,2</sup>, Odang Carman<sup>3</sup>, Alimuddin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Magister Ilmu Akuakultur, Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup> Jurusan Perikanan, FIKP Universitas Hasanuddin, Makassar

<sup>3</sup> Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor

#### ABSTRACT

Promoter in transgene construct plays an important role on regulating of transgene expression level in transgenic fish. In fish transgenesis, researcher convinced that use all-fish gene construct is safety and prospective. This study was performed to compare effectiveness  $\beta$ -actin promoter, - the promoter which has ubiquitous, constitutive, housekeeping characteristics, from common carp (homologous) and from tilapia and medaka  $\beta$ -actin promoters (heterologous) in driving of green fluorescent protein (GFP) expression as a model of target gene on common carp transgenesis. These gene constructs were separately microinjected into cytoplasm of 60 one-cell-stage common carp embryos. The results suggested that 70% survival rate at embryo stage and 45% hatching rate values showed that the microinjection was performed successfully. Percentage of embryos expressing GFP gene were slightly higher when injected using common carp and medaka promoters than those of using tilapia promoter. Percentage of larvae expressing GFP using common carp promoter was similar with medaka promoter. Furthermore, GFP expression using common carp  $\beta$ -actin promoter could be detected at one-week-old larvae, while GFP expressing using medaka  $\beta$ -actin promoter was lasted at 2-day-old larvae. The results demonstrated that homologous promoter more effective in driving of a target gene expression than that of heterologous promoter.

Key words: homologous promoter, GFP, transgenesis, common carp

#### ABSTRAK

Promoter dalam konstruksi transgen berperan penting dalam pengaturan tingkat ekspresi transgen pada ikan transgenik. Dalam transgenesis ikan, peneliti meyakini bahwa penggunaan konstruksi gen "all-fish" adalah aman dan prospektif. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan efektivitas promotor  $\beta$ -aktin, - promotor yang memiliki ciri *ubiquitous*, *constitutive*, dan *housekeeping*, dari ikan dari ikan mas (homolog) dan ikan nila dan ikan medaka (heterolog) dalam mengendalikan ekspresi gen GFP sebagai model gen pada transgenesis ikan mas. Setiap konstruksi gen tersebut diinjeksikan secara terpisah ke sitoplasma embrio ikan mas fase 1 sel sebanyak 60 embrio. Hasil penelitian dengan kelangsungan hidup embrio 70% dan derajat penetasan 45% menunjukkan bahwa kegiatan mikroinjeksi berhasil dengan baik. Persentase embrio mengekspresikan gen GFP yang diinjeksi konstruksi gen dengan promotor  $\beta$ -aktin ikan mas dan ikan medaka sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan promotor  $\beta$ -aktin ikan nila. Selanjutnya, ekspresi gen GFP yang dikendalikan oleh promotor  $\beta$ -aktin ikan mas dapat dideteksi pada larva berumur 1 minggu, sedangkan ekspresi GFP dengan promotor  $\beta$ -aktin ikan medaka hanya bisa terdeteksi hingga larva berumur 2 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa promotor homolog adalah lebih efektif dalam mengatur ekspresi gen target dibandingkan dengan promotor heterolog.

Kata kunci: promotor homolog, GFP, transgenesis, ikan mas

#### PENDAHULUAN

Efektivitas ekspresi gen dalam transgenesis ditentukan oleh promotor yang diligasi pada posisi *upstream* dari gen target

dalam suatu konstruksi. Promoter merupakan suatu sekuen DNA yang terletak di bagian hulu (*upstream*; terminal 5') dari struktural gen yang menginisiasi, mengatur letak, waktu, dan tingkat ekspresi gen (Toha, 2001;

Beaumont dan Hoare, 2003). Pada awal perkembangan transgenesis ikan, peneliti menggunakan konstruksi gen dengan promoter yang berasal dari mamalia dan virus, tetapi dengan alasan keamanan pangan, maka dikembangkanlah konstruksi gen dengan promoter yang berasal dari ikan, atau disebut sebagai konstruksi gen *all-fish*. Namun demikian, penggunaan promoter dari ikan yang sama (homolog) atau hubungan kekerabatannya dekat dengan ikan transgenik akan memberikan hasil yang lebih optimum (Hwang *et al.*, 2003).

Beberapa jenis promoter yang telah diisolasi dan diuji pada beberapa spesies ikan oleh para peneliti ialah promoter *cytomegalovirus* (CMV) dari virus manusia, *elongation factor-1 $\alpha$*  (EF-1 $\alpha$ ) dari ikan medaka,  $\beta$ -aktin dari ikan medaka dan *myosin light chain-2* (Mylz-2) dari ikan zebra (Alimuddin, 2003). Berdasarkan penelitian Alimuddin (2003) pada ikan zebra, promoter  $\beta$ -aktin dan Mylz-2 menunjukkan aktivitas paling kuat dibandingkan EF-1 $\alpha$ , sedangkan CMV menunjukkan aktivitas paling rendah. Hal ini diduga karena promoter CMV yang berasal dari virus manusia ini tidak semua elemen *cis-acting*-nya dikenali oleh faktor *trans-acting* ikan zebra, sedangkan promoter lainnya yang berasal dari ikan menunjukkan aktivitas yang tinggi. Selanjutnya  $\beta$ -aktin merupakan promoter yang bersifat *house-keeping*; selalu aktif sepanjang hidup organisme. Selain itu, promoter  $\beta$ -aktin juga mempunyai sifat *ubiquitous* (Hackett, 1993), yaitu promoter ini akan aktif di mana-mana, dan *constitutive* (Volckaert *et al.*, 1994) yang berarti bahwa promoter ini dapat aktif tanpa diberikan rangsangan dari luar seperti suhu dan hormon. Promoter ini sering digunakan dalam penelitian transgenesis seperti pada ikan mas (Liu *et al.*, 1990), ikan zebra (Higashijima *et al.*, 1997), ikan medaka (Hamada *et al.*, 1998), ikan *mud loach* (Nam *et al.*, 2001), ikan nila (Hwang *et al.*, 2003) dan ikan kakap merah (Kato *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian, dikemukakan bahwa promoter heterolog (promoter yang berasal dari ikan yang berbeda dengan ikan uji) memiliki efektivitas yang berbeda dengan promoter homolog (promoter yang berasal dari ikan yang sama dengan ikan uji).

Seperti pada ikan zebra menggunakan promoter  $\beta$ -aktin dari ikan kakap merah menunjukkan tingkat kelangsungan hidup hanya 63% dibandingkan dengan penggunaan promoter ini pada spesies yang sama tingkat kelangsungan hidupnya mencapai 95% (Kato *et al.*, 2007). Oleh karena itu, dalam penelitian ini kami membandingkan efektivitas promoter homolog dengan promoter heterolog pada ikan mas.

Efektivitas promoter dapat dilihat jika promoter ini disambungkan dengan gen target. Gen target yang digunakan dalam penelitian ini adalah *green fluorescent protein* (GFP). Gen ini juga berperan sebagai gen penanda (*marker*) karena memiliki kelebihan dalam pendeteksiannya yaitu tidak membutuhkan penambahan substrat dan dapat divisualisasikan dalam ekspresi sel di atas pemaparan cahaya UV dengan menggunakan mikroskop fluoresen atau secara kuantitatif dengan menggunakan PCR (Iyengar *et al.*, 1996). Dengan menggunakan promoter  $\beta$ -aktin dari ikan mas (*Cyprinus carpio*) sebagai promoter homolog, ikan nila (*Oreochromis niloticus*), dan ikan medaka (*Oryzias latipes*) sebagai promoter heterolog yang dicobakan pada ikan mas, diharapkan model ini dapat diaplikasikan pada ikan-ikan budidaya lainnya sehingga proses transgenesis akan lebih optimum.

## BAHAN DAN METODE

### Mikroinjeksi

Tiga jenis konstruksi gen digunakan dalam penelitian ini, yaitu pccBA-GFP, ptiBA-GFP (Alimuddin *et al.*, 2007a) dan pmkBA-GFP (Hamada *et al.*, 1998) yang masing-masing dikontrol oleh promoter ccBA ikan mas (panjang sekuen 1,3 kb), tiBA ikan nila (1,2 kb; Octavera, 2008) dan mkBA ikan medaka (3,7 kb; Takagi *et al.*, 1994). Setiap konstruksi gen tersebut dengan konsentrasi 50  $\mu$ g/mL dalam larutan KCl 0,1 M diinjeksikan ke blastodisk embrio ikan mas fase 1-2 sel, sebanyak 10% volume blastodisk. Proses mikroinjeksi dilakukan di bawah mikroskop dengan bantuan mikro-manipulator. Jumlah embrio yang diinjeksi adalah sebanyak 30 butir dan masing-masing dilakukan 2 kali ulangan untuk setiap

konstruksi gen. Embrio hasil injeksi diinkubasi pada akuarium dengan suhu air sekitar 28°C. Selama pengamatan embrio yang mati dibuang.

### Pengamatan menggunakan mikroskop fluoresens

Embrio-embrio yang telah diinjeksi, dimasukkan ke dalam cawan petri dan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop fluoresen. Pengamatan dilakukan setiap 2 jam dari waktu fertilisasi telur. Embrio dan larva yang mengekspresikan GFP difoto menggunakan kamera CCD yang terpasang pada mikroskop fluoresens. Data yang dikumpulkan adalah derajat kelangsungan hidup embrio (DKH-e), derajat penetasan (DP), persentase embrio yang mengekspresikan gen GFP (PEMG), persentase larva yang mengekspresikan gen GFP (PLMG), dan tingkat serta pola ekspresi gen GFP. Tingkat ekspresi gen GFP dibagi menjadi 3 tingkat, yaitu pendar hijau kurang terang, terang, dan sangat terang. Pola ekspresi gen GFP diamati pada jam ke-4 setelah mikroinjeksi hingga fase larva. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji efektivitas promoter dilakukan dengan membandingkan promoter  $\beta$ -aktin ikan mas hasil isolasi dengan promoter  $\beta$ -aktin yang berasal dari ikan medaka (Hamada *et al.*, 1998) dan ikan nila (Hwang *et al.*, 2003). Pengujian dilakukan dengan melihat tingkat dan pola ekspresi secara kuantitatif. Sebagai data pendukung dilakukan juga analisis terhadap derajat kelangsungan hidup embrio (DKH-e), derajat penetasan (DP), dan

persentase embrio (PEMG) dan larva (PLMG) yang mengekspresikan gen GFP. Nilai DKH-e, DP, PEMG dan PLMG diperlihatkan pada Tabel 1. Nilai DKH-e pada ccBA-GFP (70,0%) 1,27 kali lebih tinggi dibandingkan dengan mkBA-GFP (55,0%) dan 1,75 kali dengan tiBA-GFP (40,0%), tetapi nilai DP pada ccBA-GFP relatif sama dengan mkBA-GFP, yaitu 45%, dan 3,86 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tiBA-GFP (11,7%). Hal ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan ccBA-GFP ternyata tidak terlalu mempengaruhi perkembangan embrio. Namun, nilai DKH-e dan DP dari perlakuan masih lebih rendah jika dibandingkan kontrol. Hal ini diduga disebabkan adanya kerusakan sel akibat injeksi atau kemungkinan akibat tingginya volume larutan DNA yang diinjeksikan. Penggunaan volume larutan DNA yang tinggi ditujukan untuk memastikan material genetik masuk dalam pronukleus (Zbikowska, 2003). Namun, semakin tinggi konsentrasi larutan DNA yang diinjeksikan, maka semakin tinggi juga kemungkinan mutagenesis atau jumlah partikel asing yang dapat menyebabkan kematian pada embrio (Hackett, 1993).

Sementara itu PEMG dan PLMG hanya ditemukan pada perlakuan. PEMG pada mkBA-GFP (35,0%) 1,75 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ccBA-GFP (20,0%) dan 4,22 kali dengan tiBA-GFP (8,3%). Selanjutnya, PLMG pada ccBA-GFP (16,7%) lebih tinggi dibandingkan dengan mkBA-GFP (11,7%), sedangkan pada tiBA-GFP tidak ada larva yang mengekspresikan GFP. Dengan jumlah jenis faktor transkripsi sama, dapat disimpulkan bahwa promoter

Tabel 1. Derajat kelangsungan hidup embrio (DKH-e), derajat penetasan (DP), persentase embrio yang mengekspresikan gen GFP (PEMG) dan persentase larva yang mengekspresikan gen GFP pada ikan mas.

Jenis Promoter	Embrio yang diinjeksi (butir) $r=2^*$	DKH-e (%)	DP (%)	PEMG (%)	PLMG (%)
ccBA	30	70 $\pm$ 14,1	45 $\pm$ 11,8	20 $\pm$ 0	16,7 $\pm$ 4,7
mkBA	30	55 $\pm$ 16,5	45 $\pm$ 7,1	35 $\pm$ 25,9	11,7 $\pm$ 2,4
tiBA	30	40 $\pm$ 9,4	11,7 $\pm$ 7,1	8,3 $\pm$ 2,4	0 $\pm$ 0
Kontrol	30	78,3 $\pm$ 7,1	65 $\pm$ 2,4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Keterangan: r= ulangan

Tabel 2. Tingkat ekspresi dan persentase embrio ikan mas yang mengekspresikan gen GFP yang dikendalikan oleh promoter  $\beta$ -aktin ikan mas (ccBA), ikan medaka (mkBA), ikan nila (tiBA).

Konstruksi Gen	Persentase embrio berdasarkan tingkat ekspresi GFP			Total embrio yang mengekspresikan GFP (%)
	1	2	3	
ccBA-GFP	8,3±2,4	8,3±2,4	3,3±0,0	20±0
mkBA-GFP	13,3±9,4	13,3±9,4	8,3±7,1	35±25,9
tiBA-GFP	5±2,4	3,3±0,0	0,0±0,0	8,3±2,4

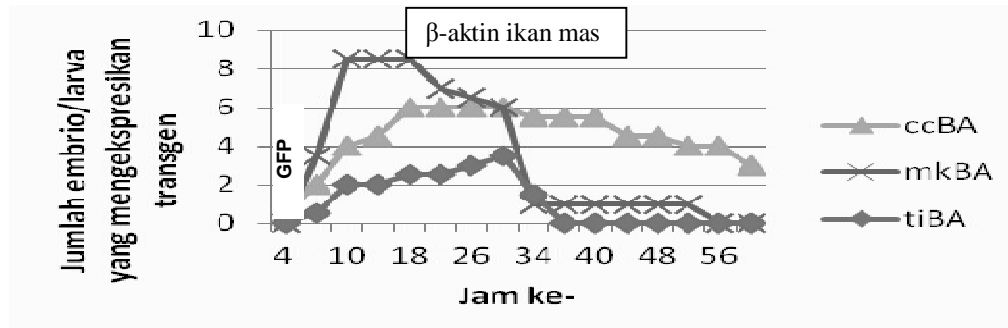
Keterangan: 1. Pendar hijau kurang terang. 2. Pendar hijau terang. 3. Pendar hijau sangat terang mkBA-GFP = 35%, ccBA-GFP = 20%, tiBA-GFP = 8,3%.

homolog (ccBA) lebih efektif dalam mengatur ekspresi gen target dibandingkan dengan promoter heterolog (mkBA dan tiBA). Tingkat ekspresi gen GFP yang dihasilkan dari perlakuan dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu pendaran hijau kurang terang, pendaran hijau terang, dan pendaran hijau sangat terang. Perbandingan tingkat ekspresi antar konstruksi DNA diamati pada jam ke-30 untuk promoter dari ikan mas (ccBA) dan promoter dari ikan nila (tiBA), sedangkan promoter dari ikan medaka (mkBA) pada jam ke-10 dan disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 terlihat bahwa pada ketiga klasifikasi tingkat ekspresi gen GFP, persentase embrio yang mengekspresikan GFP pada promoter mkBA lebih tinggi dibandingkan dengan promoter ccBA dan promoter tiBA. Selanjutnya, promoter ccBA lebih tinggi dibandingkan dengan promoter tiBA. Hal ini menunjukkan bahwa promoter homolog (ccBA) memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan yang heterolog (tiBA). Namun demikian, meskipun promoter mkBA mempunyai sifat heterolog bagi ikan mas, perbedaan panjang sekuen yang sangat signifikan antara promoter mkBA (3,7 kb) dan ccBA (1,3 kb) mungkin mempengaruhi ekspresi GFP.

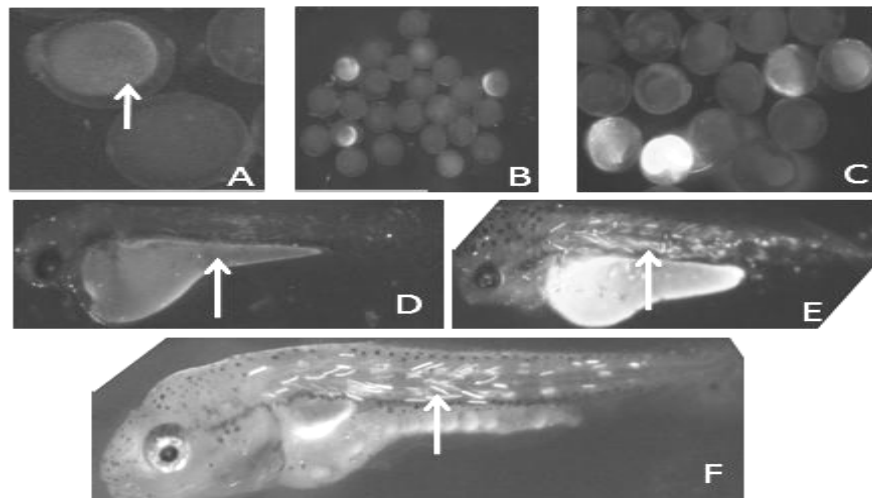
Tingkat ekspresi gen pada setiap promoter ada yang kuat dan ada yang lemah. Hal ini terkait dengan kesesuaian faktor *cis* (*cis-acting*) dan *trans* (*trans-acting*) (Alimuddin, 2003). Selanjutnya, tingkat ekspresi gen yang dikendalikan oleh suatu promoter bervariasi antar embrio/larva. Hal ini umum ditemukan seperti dijelaskan oleh Chou *et al.* (2001). Jika fragmen DNA yang terdiri dari suatu gen target atau gen penanda homolog/

heterolog ditransfer maka akan sangat umum untuk menemukan kejadian mosaik (*mosaic*), ekspresi sementara (*transient expression*), dan ekspresi yang beranekaragam dari gen yang ditransfer dalam ikan transgenik (Chou *et al.*, 2011). Variasi ekspresi gen dimungkinkan karena distribusi yang tidak sama dari transgen pada embrio-embrio ikan yang diinjeksi. Ekspresi pada setiap embrio sebagian atau tidak tersebar merata; ada beberapa jaringan yang terekspresi kuat sementara yang lain tidak ada. Kebanyakan tingkat ekspresi diduga berhubungan kuat dengan jumlah copy transgen pada setiap sel (Hwang *et al.*, 2003). Alimuddin *et al.* (2007b) menjelaskan bahwa ekspresi gen yang lemah atau bahkan tidak ada sama sekali bila terintegrasi di sentromer atau di telomer dimana DNA tidak aktif mengalami transkripsi dan diposisikan di heterokromatin. Selain itu, kemungkinan integrasi gen terjadi secara acak dalam kromosom, sehingga terjadi perbedaan tingkat ekspresi gen di jaringan yang berbeda.

Pola ekspresi gen GFP yang diamati pada embrio hasil mikroinjeksi bersifat sementara dimana ekspresi yang dihasilkan awalnya rendah, kemudian meningkat dan akhirnya menurun (Gambar 1). Pola ekspresi sementara (*transient expression*) gen GFP menggunakan ccBA-GFP mulai terlihat pada jam ke-6 setelah fertilisasi (fase blastula) kemudian mencapai puncak pada jam ke-30 setelah fertilisasi (fase perkembangan organogenesis) dan ekspresi ini pada larva masih tetap bertahan hingga larva berumur 1 minggu (Gambar 2). Pola ekspresi sementara pada mkBA-GFP mulai terlihat pada jam ke-



Gambar 1. Pola ekspresi gen GFP, yang dikendalikan oleh promoten  $\beta$ -aktin ikan mas (ccBA), ikan medaka (mkBA), ikan nila (tiBA).



Gambar 2. Ekspresi gen GFP menggunakan promoten  $\beta$ -aktin ikan mas (ccBA) pada embrio dan larva ikan mas. Inisiasi ekspresi terdeteksi pada jam ke-6 (A), Ekspresi gen pada jam ke-10 (B), Puncak ekspresi pada jam ke-30 (C) Ekspresi pada larva jam ke-34 (D), Ekspresi pada larva jam ke-56 (E), dan Ekspresi pada larva jam ke-192 (F).

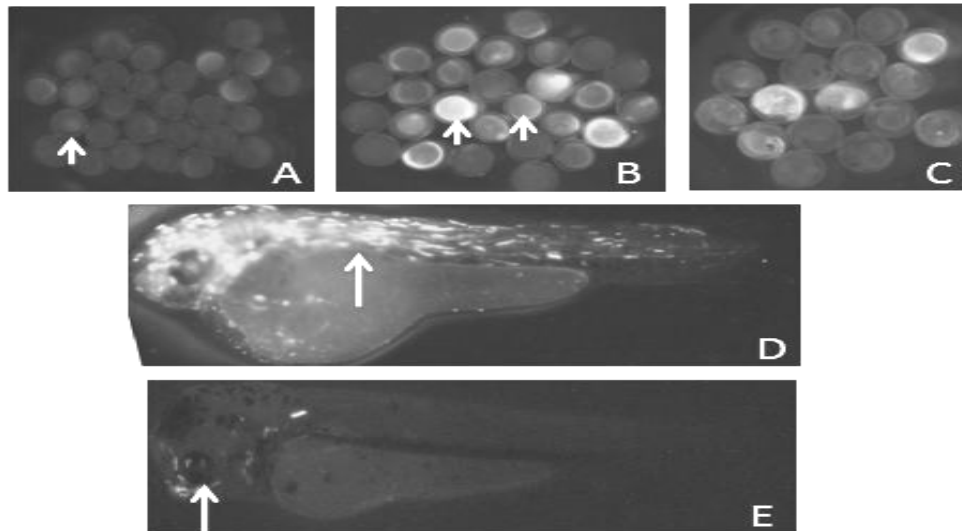
6 setelah fertilisasi (fase blastula), meningkat pada jam ke-10 setelah fertilisasi (fase gastrula), dan menurun pada jam ke-56 (pada larva) (Gambar 3). Sedangkan pola ekspresi sementara pada tiBA-GFP muncul pada jam ke-6 setelah fertilisasi (fase blastula), meningkat pada jam ke-32 setelah fertilisasi (fase perkembangan organogenesis) hingga tidak terlihat lagi pada larva (Gambar 4). Ekspresi gen GFP yang tinggi dan bertahan lebih lama menunjukkan bahwa promoter  $\beta$ -aktin dari ikan mas memiliki efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan promoter  $\beta$ -aktin dari ikan medaka dan ikan nila. Pola ekspresi gen asing yang tinggi terjadi pada fase *mid blastula transition* (MBT) hingga fase gastrula sebagai hasil dari akumulasi DNA yang diinjeksikan akibat replikasi selama tahap pembelahan dan akumulasi enzim yang menyebabkan dimulainya proses

transkripsi pada fase MBT (Iyengar *et al.*, 1996). Ekspresi gen mulai menurun dengan waktu yang berbeda pada tiap promoter. Hal ini mungkin berhubungan dengan aktivitas enzim eksonuklease dan/atau endonuklease di dalam embrio dan larva. Aktivitas enzim tersebut dalam memotong konstruksi DNA asing diduga berbeda antara yang homolog dan heterolog, sehingga kecepatan turunnya ekspresi GFP menjadi berbeda.

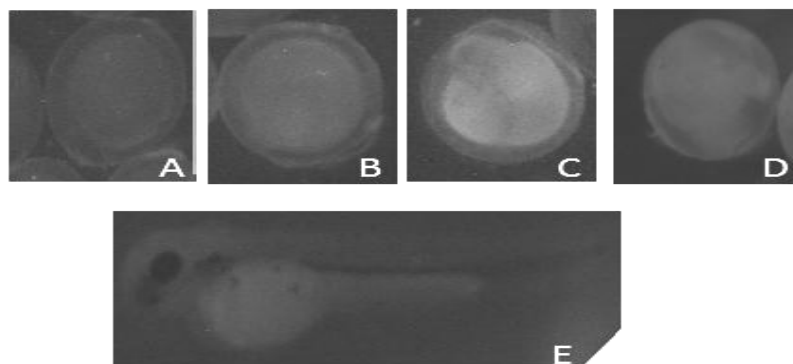
Setelah menetas, ekspresi transgen menggunakan ccBA-GFP dan mkBA-GFP masih tetap terlihat pada larva. Posisi ekspresi gen GFP pada larva dengan menggunakan transgen ccBA-GFP terdapat pada kepala, kuning telur dan otot (Gambar 5), sementara dengan mkBA-GFP, posisi ekspresi GFP pada larva yang terlihat di kepala, otot dan ekor (Gambar 6). Ekspresi gen GFP yang dikendalikan oleh promoter

ccBA-GFP dan promoter mkBA-GFP tidak spesifik pada suatu organ. Hal ini berkenaan dengan sifat *ubiquitous* (terdapat dimana-mana) dari promoter  $\beta$ -aktin yang artinya promoter ini dapat aktif pada semua jaringan otot. Menurut Iyengar *et al.* (1996), distribusi yang tidak sama dari copy transgen dalam jaringan poliploid seperti sel-sel otot atau sel-sel pada lapisan *syncytial* kuning telur (YSL) yaitu lapisan perifer dari sel kuning telur yang mengandung sejumlah besar nukleus raksasa; mungkin menjelaskan tingginya variabilitas ekspresi transgen dalam jaringan. Lebih lanjut dijelaskan bahwa perbedaan ekspresi transgen mungkin berhubungan dengan posisi dimana transgen terintegrasi dalam kromosom yang mengaktifkan gen

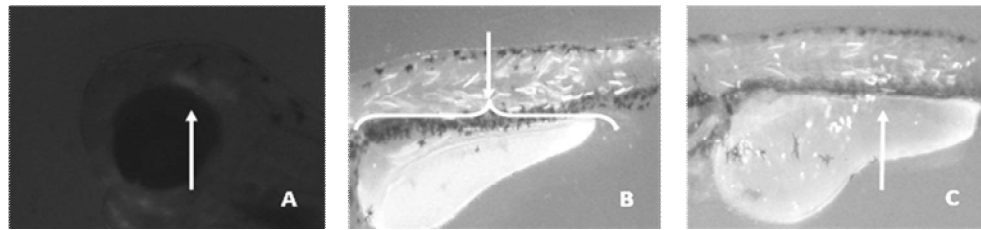
tersebut di otot. Ekspresi gen GFP menggunakan ccBA-GFP dan mkBA-GFP pada larva tergolong kuat. Hal ini terjadi diduga karena ekspresi dapat muncul dan menguat kembali pada saat dimana pertumbuhan berlangsung cepat sehingga banyak sel yang membelah dan kembali terjadi peningkatan replikasi atau dapat pula terjadi pada saat mulai terjadinya pembentukan otot-otot karena promoter  $\beta$ -aktin diisolasi dari otot dan dapat aktif pada semua jaringan otot (Winkler *et al.*, 1991). Kejadian-kejadian ini mungkin terjadi mengingat promoter  $\beta$ -aktin memiliki sifat *housekeeping* (dapat aktif kapan saja) dan *constitutive* (aktif tanpa faktor pemicu). Akan tetapi ekspresi ini kelihatan tidak nampak



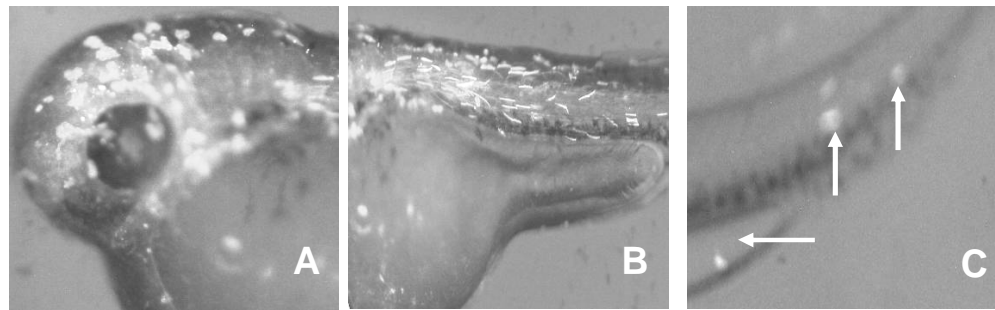
Gambar 3. Ekspresi gen GFP menggunakan promoten  $\beta$ -aktin ikan medaka (mkBA) pada embrio dan larva ikan mas. Inisiasi ekspresi terdeteksi pada jam ke-6 (A), Puncak ekspresi gen pada jam ke-10 (B), Ekspresi gen pada jam ke-30 (C), Ekspresi pada larva jam ke-34 (D) dan ekspresi pada larva jam ke-56 (E).



Gambar 4. Ekspresi gen GFP menggunakan promoten  $\beta$ -aktin ikan nila (tiBA) pada embrio ikan mas. Inisiasi ekspresi GFP pada jam ke-6 (A), Ekspresi gen pada jam ke-10 (B), Puncak ekspresi gen pada jam ke-30 (C), Akhir ekspresi pada jam ke-32 (D) dan ekspresi gen tidak nampak lagi pada larva jam ke-34 (E).



Gambar 5. Ekspresi gen GFP menggunakan promoten  $\beta$ -aktin ikan mas (ccBA) pada embrio ikan mas pada kepala (A), kuning telur (B), dan otot (C).



Gambar 6. Ekspresi gen GFP menggunakan promoten  $\beta$ -aktin ikan medaka (mkBA) pada embrio ikan mas pada kepala (A), otot (B), dan ekor (C).

lagi pada waktu tertentu karena telah tertutup oleh warna kulit, daging dan sebagainya bergantung dari kemampuan masing-masing promoter dalam mengekspresikan gen GFP. Lain halnya dengan ekspresi gen menggunakan tiBA-GFP pada larva tidak nampak lagi. Ekspresi gen GFP ditemukan hanya sampai fase gastrula, sedangkan pada embrio yang sudah melewati fase tersebut (*older embryos*) DNA asing yang bertahan hanya dalam jumlah yang terbatas akibat adanya degradasi (Winkler *et al.*, 1991).

### KESIMPULAN

Berdasarkan tingkat ekspresi, jumlah embrio yang mengekspresikan dan lama ekspresi gen GFP, dapat disimpulkan bahwa promoter homolog memiliki efektivitas lebih tinggi daripada promoter heterolog pada transgenesis ikan mas.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan banyak terima kasih kepada Kepala Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi yang telah memberikan izin menggunakan mikroskop fluoresens.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, 2003. Introduction and Expression of foreign  $\Delta 6$  desaturase-Like Gene in a Teleostean fish. [Thesis] Graduate School of Fisheries Science. Tokyo University of Fisheries.
- Alimuddin, Sumantadinata, K., Arifin, O.Z., 2007a. Teknologi transgenesis dalam peningkatan kecepatan tumbuh ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*). Laporan Riset Insentif KNRT.
- Alimuddin, Yoshizaki, G., Carman, O., Takeuchi, T., 2007b. Efektivitas promoter hCMV, mEF1 $\alpha$  dan mAct dalam mengatur ekspresi gen asing pada transgenik ikan zebra. J. Akuakultur Indonesia 6(1), 65–77.
- Beaumont, Hoare., 2003. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Blackwell Science Ltd. Blackwell Publishing Inc. USA, 128.
- Chou, C.Y., Horng, LS., Tsai, HJ., 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka *Oryzias latipes* at the F0 generation. Transgenic Research 10, 303–315.
- Hackett, PB., 1993. The molecular biology of transgenic fish. In: Hocachka and

- Mommesen (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 2, 218–229.
- Hamada, K., Tamaki, K., Sasado, T., Watai, Y., Kani, S., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Kinoshita, M., Kohno, R., Takagi, S., Kimura, M., 1998. Usefulness of the medaka  $\beta$ -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka *Oryzias latipes*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7, 173–180.
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., Eguchi, G., 1997. High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoter of zebrafish origin. *Developmental Biology* 192, 289–299.
- Hwang, GL., Rahman, MA., Razak, SA., Sohm, F., Farahmand, H., Smith, A., Brooks, C., Maclean, N., 2003. Isolation and characterisation of tilapia  $\beta$ -actin promoter and comparison of its activity with carp  $\beta$ -actin promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1625, 11–18.
- Iyengar, A., Muller, F., Maclean, N., 1996. Regulation and expression of transgenes in fish—a review. *Transgenic Research* 5, 147–166.
- Kato, K., Takagi, M., Tamaru, Y., Akiyama, S-1., Konishi, T., Murata, O., Kumai, H., 2007. Construction of an expression vector containing  $\beta$ -actin promoter region for gene transfer by microinjection in Red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 73, 440–445.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, AJ., Guise, KS., Kapucinski, AR., Hacket, PB., 1990. Functional analysis of elements affecting of the  $\beta$ -actin gene of carp. *Molecular Cell Biology* 10, 3432–3440.
- Nam, YK., Noh, JK., Cho, YS., Cho, HJ., Cho, KN., Kim, CG., Kim, DS., 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic Mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research* 10, 353–362.
- Octavera, A., 2008. Isolasi promoter  $\beta$ -actin ikan nila *Oreochromis niloticus* dengan metode *degenerate* PCR. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Takagi, S., Sasado, G., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., Kimura, M., 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 192–199.
- Toha, A.H.A., 2001. *Deoxyribo Nucleic Acid: Keanekaragaman, Ekspresi, Rekayasa dan Efek Pemanfaatannya*. Alfabeta. Bandung, 55–56.
- Winkler, C., Vielkind, JR., Scharl, M., 1991. Transient Expression of Foreign DNA During Embryonic and Larval Development of the Medaka Fish *Oryzias latipes*. *Molecular General Genetics* 226, 129–140.
- Volckaert, FA., Hellemans, BA., Galbusera, P., Ollevier, F., 1994. Replication, expression and fate of foreign DNA during embryonic and larval development of the African catfish *Clarias gariepinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(2), 57–69.
- Zbikowska, HM., 2003. Fish can be first advances in fish transgenesis for commercial applications: review. *Transgenic Research* 12, 379–389.