

Transplantasi sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* pada larva ikan mas *Cyprinus carpio*

Testicular cells transplantation of neon tetra *Paracheirodon innesi* in common carp *Cyprinus carpio*

Muhammad Firdaus, Alimuddin*, Komar Sumantadinata

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

*Surel: alimuddin_alsani@yahoo.com

ABSTRACT

The neon tetra *Paracheirodon innesi* is one of the most popular ornamental fishes in the world. Its productivity seemed low because of the relatively low fecundity and hard to maintain the spawning condition. Transplantation of neon tetra testicular cells to common carp as surrogate broodstock, is a potential breakthrough for mass production of juvenile. We developed testicular cell transplantation by optimizing the size of donor that have highest spermatogonia proportion and testicular cell colonization level. The neon tetras divided into three groups of size based on the total body length (TL), namely: small (TL<18.00 mm), medium (TL=18.00–23.00 mm), and large (TL>23.00 mm). Then, we defined histomorphological characteristic of neon tetra testicular cells including diameter and volume of cell. Gonado somatic index (GSI) and proportion of spermatogonia from each group were also measured to determine group with highest spermatogonia proportion. Neon tetra testicular cells from each group that contain spermatogonial cells, were then injected into common carp larvae to examine it's colonization level. The results of testicular cells histomorphological characteristic analysis showed that spermatogonia mean diameter and cell volume were $6.75 \pm 1.30 \mu\text{m}$ and $1,420.50 \pm 768.20 \mu\text{m}^3$, respectively. Medium-size fish group showed the highest spermatogonia proportion ($20.95 \pm 1.29\%$) and also testicular cells colonization level ($85.00 \pm 7.07\%$). In conclusion, as donor for testicular cells transplantation, medium-size neon tetra was better than large and small size.

Keywords: testicular cells, transplantation, colonization, common carp, neon tetra

ABSTRAK

Ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* merupakan salah satu ikan hias paling populer di dunia. Produktivitas ikan ini rendah karena memiliki fekunditas yang relatif sedikit dan kondisi pemijahan yang sulit dipenuhi. Transplantasi sel testikular ikan neon tetra kepada ikan mas sebagai induk semang merupakan terobosan potensial untuk produksi benih secara massal. Pada penelitian ini, transplantasi sel testikular dikembangkan melalui optimasi ukuran donor yang memiliki proporsi spermatogonia dan kolonisasi sel testikular tertinggi. Ikan neon tetra dibagi ke dalam tiga kelompok berdasarkan panjang total badan (PT), yaitu *small* (PT<18,00 mm), *medium* (PT=18,00–23,00 mm), dan *large* (PT>23,00 mm). Selanjutnya, ditentukan karakteristik histomorfologi dari sel testikular ikan neon tetra yang meliputi diameter dan volume sel. Indeks kematangan gonad (IKG) dan proporsi spermatogonia dari setiap kelompok juga diukur untuk menentukan kelompok dengan proporsi spermatogonia tertinggi. Sel testikular ikan neon tetra dari setiap kelompok ukuran yang mengandung sel spermatogonia selanjutnya diinjeksikan kepada larva ikan mas untuk mengevaluasi tingkat kolonisasinya. Hasil dari analisis karakteristik histomorfologi sel testikular menunjukkan bahwa rerata diameter dan rerata volume sel spermatogonia berturut-turut adalah $6,75 \pm 1,30 \mu\text{m}$ dan $1.420,50 \pm 768,20 \mu\text{m}^3$. Kelompok ikan ukuran medium memperlihatkan proporsi spermatogonia ($20,95 \pm 1,29\%$) dan sekaligus tingkat kolonisasi sel testikular ($85,00 \pm 7,07\%$) tertinggi. Dapat disimpulkan bahwa sebagai donor untuk transplantasi sel testikular, kelompok ikan neon tetra ukuran *medium* lebih baik dibandingkan dengan ukuran *large* dan *small*.

Kata kunci: sel testikular, transplantasi, kolonisasi, ikan mas, ikan neon tetra

PENDAHULUAN

Ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* (famili Characidae) merupakan spesies ikan hias dengan potensi ekonomi tinggi dan mengalami peningkatan nilai ekspor relatif pesat pada beberapa tahun terakhir (Budiardi *et al.*, 2007). Ikan ini berasal dari Rio Putumayo, Peru Timur (Alderton, 2005) dan menjadi salah satu ikan peliharaan paling dikenal di kalangan penghobi ikan hias (Saxby *et al.*, 2010). Permintaan ikan neon tetra di Amerika Serikat sebagai salah satu pangsa pasar ikan hias terbesar, mencapai 22,7 juta ekor pada tahun 1992 dan diproyeksikan akan terus meningkat (Saputro *et al.*, 2007). Tingkat permintaan yang tinggi menyebabkan harga ikan neon tetra di pasar internasional dapat mencapai US\$ 1 atau setara dengan Rp 9.000 untuk setiap ekornya. Meskipun demikian, budidaya ikan neon tetra masih terhambat oleh keterbatasan teknologi untuk menghasilkan benih secara massal, seragam, dan kontinu. Hal tersebut disebabkan fekunditas yang relatif rendah sekitar 180 telur/induk, belum bisa dipijahkan secara buatan, dan memiliki persyaratan kondisi lingkungan pemijahan yang relatif sulit dipenuhi.

Transplantasi sel germinal atau *germ cell transplantation* (GCT) merupakan teknologi manipulasi sel germinal yang awalnya dipelopori pada tahun 1994 (Majhi *et al.*, 2009). Takeuchi *et al.* (2003) telah melaporkan keberhasilan teknologi transplantasi sel germinal dengan memproduksi ikan *rainbow trout Oncorhynchus mykiss* menggunakan ikan salmon masu *Oncorhynchus masou* sebagai induk semang. Teknologi ini dilakukan dengan cara mentransplantasikan sel germinal yang berupa *primordial germ cells* (PGC) (Takeuchi *et al.*, 2003) atau sel spermatogonia yang belum terdiferensiasi (Okutsu *et al.*, 2006a) ke dalam rongga perut larva ikan resipien, selanjutnya sel donor berdiferensiasi menjadi telur atau sperma ikan donor di dalam tubuh ikan resipien. Pemijahan ikan resipien yang membawa sperma dan telur yang berkembang dari sel donor, akan menghasilkan ikan donor (Okutsu *et al.*, 2006a). Hasil tersebut bahkan dapat dioptimasi dengan menggunakan resipien triploid, sehingga dihasilkan 100% larva donor (Okutsu *et al.*, 2006b).

Melalui aplikasi teknologi transplantasi sel germinal, permasalahan ketersediaan benih ikan neon tetra diduga dapat teratasi. Benih ikan neon tetra dapat diproduksi secara massal menggunakan ikan mas *Cyprinus carpio* sebagai induk semang

dengan keunggulan berupa fekunditas yang dapat mencapai 85–125 ribu telur/kg bobot induk pada strain Sinyonya, dapat dipijahkan secara buatan, serta memiliki masa pakai induk yang dapat mencapai tiga tahun (Imanpour & Enayat, 2009). Ditinjau dari sistem klasifikasi, ikan neon tetra dan ikan mas berasal dari ordo yang berbeda sehingga teknologi transplantasi sel germinal yang diterapkan merupakan xeno transplantasi. Ikan mas merupakan anggota dari ordo Cypriniformes, sementara ikan neon tetra merupakan anggota dari ordo Characiformes.

Studi morfologi dan proporsi sel testikular ikan donor merupakan tahapan penting pada pengembangan transplantasi sel germinal, terutama untuk menyediakan informasi dalam mengidentifikasi karakteristik dan kelimpahan spermatogonia yang akan digunakan sebagai sel target. Penggunaan spermatogonia sebagai sel target disebabkan kelompok sel spermatogonia tertentu merupakan sel yang memiliki keistimewaan, yaitu karakteristiknya menyerupai PGC atau sel punca dengan tingkat *development plasticity* yang tinggi sehingga dapat berkembang menjadi sel spermatozoa dan oosit (Okutsu *et al.*, 2006a).

Sel spermatogonia ikan neon tetra yang ditransplantasikan pada larva ikan mas sebagai resipien harus mampu mengalami kolonisasi sebagai tahapan kritis pertama yang menentukan keberhasilan transplantasi sel ke dalam tubuh resipien. Raz (2004) menyatakan bahwa kolonisasi terjadi ketika *spermatogonial stem cell* (SSC) yang diinjeksi pada rongga peritoneal larva bermigrasi ke *genital ridge* dengan gerakan kemotaksis oleh kaki semu atau pseudopia.

Keberhasilan kolonisasi sel donor pada bagian *genital ridge* menunjukkan adanya kompatibilitas antara donor dan resipien. Sesuai dengan pendapat Okutsu *et al.* (2006a) bahwa keberhasilan transplantasi sel diawali dari kolonisasi, proliferasi, dan diferensiasi sel donor di dalam gonad resipien. Penelitian ini bertujuan menyediakan informasi awal dalam pengembangan transplantasi sel germinal pada ikan neon tetra dengan induk semang ikan mas, yaitu untuk mengidentifikasi karakteristik morfologi dan proporsi sel testikular ikan neon tetra sebagai donor, menganalisis kecocokan antara sel donor dan sel resipien dalam proses kolonisasi, serta menganalisis pengaruh proporsi sel spermatogonia dari berbagai kelompok ukuran sel donor terhadap keberhasilan terjadinya proses kolonisasi.

BAHAN DAN METODE

Sumber dan pemeliharaan ikan neon tetra

Ikan neon tetra diperoleh dari petani ikan di Cibereum (Bogor). Ikan uji dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan ukuran panjang total badan (PT), yaitu *small* (S) dengan $PT < 18,00$ mm, *medium* (M) dengan $PT = 18,00 - 23,00$ mm, dan *large* (L) dengan $PT > 23,00$ mm. Kisaran umur ikan untuk setiap kelompok tersebut adalah 30–40 hari setelah menetas (HSM), 60–70 HSM, dan 90–100 HSM. Pengelompokan ikan donor bertujuan untuk memperoleh kelompok ukuran yang memiliki proporsi dan jumlah sel spermatogonia optimum untuk transplantasi sel testikular.

Analisis histologis sel testikular ikan neon tetra

Badan utuh ikan neon tetra jantan difiksasi dalam larutan *buffered neutral formalin* (BNF) selama 48 jam. Sebelum diproses secara histologis, ikan dibersihkan menggunakan larutan *phosphate buffer saline* (PBS). Preparat histologi diproses mengikuti metode McAnulty *et al.* (2012). Preparat diwarnai dengan teknik pewarnaan hematoxilin-eosin (HE), diamati dan didokumentasi menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera. Pengamatan dan dokumentasi gambaran histologi dilakukan dari beberapa lapang pandang menggunakan perbesaran 100 kali.

Karakterisasi sel testikular ikan neon tetra yang terdiri atas spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa mengacu kepada kriteria bentuk dan ukuran yang dilaporkan oleh Quintana *et al.* (2004). Pengukuran dilakukan dengan cara membandingkan garis skala dengan diameter sel testikular. Selanjutnya hasil pengukuran dikelompokkan ke dalam beberapa ukuran diameter sel testikular dari yang terkecil sampai yang terbesar. Volume sel dihitung dari diameter sel menggunakan pendekatan rumus volume bangun bola.

Analisis indeks kematangan gonad dan proporsi sel-sel testikular

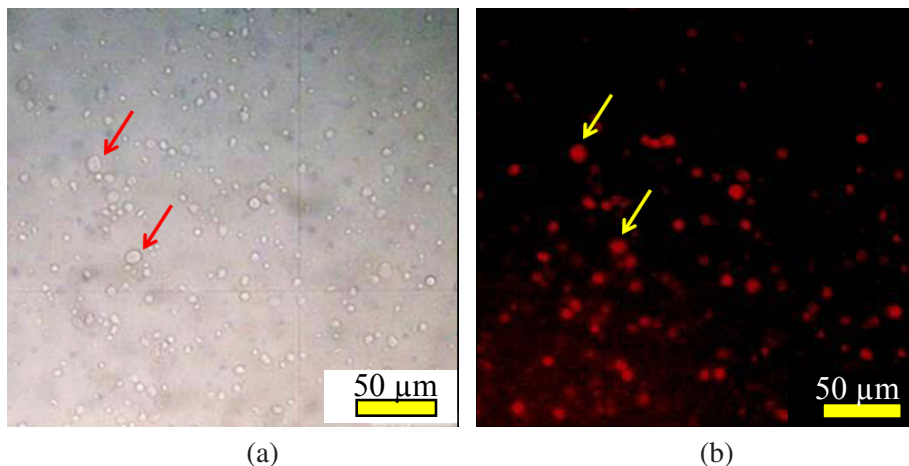
Masing-masing kelompok ikan neon tetra jantan ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,1 mg. Kelompok ukuran S ditimbang sebanyak sepuluh ekor, kelompok ukuran M sebanyak 30 ekor, dan kelompok ukuran L sebanyak 30 ekor. Indeks kematangan gonad (IKG; %) ditentukan dengan cara membandingkan bobot gonad yang ada dengan bobot tubuh ikan uji.

Testis dibersihkan dari lemak dan jaringan lain yang menempel, ditambahkan PBS, kemudian diletakkan pada cawan petri. Testis dipotong dan dicacah sampai halus selama tiga hingga lima menit. Setelah itu, sebanyak 2 mL larutan tripsin 0,5% (tripsin dilarutkan di dalam PBS) dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi potongan testis. Testis tersebut dicacah kembali dan dipipetteskan menggunakan mikropipet selama sepuluh menit sampai terlihat keruh.

Suspensi sel kemudian disaring dengan *plankton net* 60 μm , dimasukkan ke dalam tabung mikro, dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit sampai sel mengendap. Supernatan dibuang dan diganti dengan PBS sebanyak 400 μL untuk menjaga agar sel tidak rusak dan memutus kerja dari tripsin. Suspensi sel dihomogenkan menggunakan vorteks. Tahapan sentrifugasi, penggantian larutan PBS, dan homogenisasi diulang sebanyak dua kali. Selanjutnya, suspensi sel testikular diambil sebanyak 10 μL untuk dihitung kepadatannya menggunakan hemositometer Neubauer Improved (Assistant, German) dengan bantuan mikroskop. Proporsi spermatogonia diketahui dengan cara membandingkan antara jumlah sel spermatogonia dengan jumlah total sel testikular, dan hasilnya dinyatakan dalam bentuk persen (%).

Transplantasi sel testikular ikan neon tetra

Larva ikan mas diperoleh dari petani ikan di Situgede (Bogor). Sebelum digunakan sebagai resipien, larva ikan mas tersebut dipelihara hingga berumur 10 HSM dalam akuarium berukuran $100 \times 50 \times 50$ cm^3 dan diberikan pakan berupa *Daphnia* sp. beku secara *at satiation*. Ikan mas dipuaskan terlebih dahulu selama 24 jam sebelum transplantasi. Testis ikan donor didisosiasi dan dihitung jumlah sel testikularnya. Selanjutnya stok suspensi sel testikular diencerkan dengan PBS sehingga diperoleh konsentrasi sel testikular sebesar 20.000 sel/ μL . Sel testikular ditandai menggunakan pewarna sel PKH-26 (SIGMA). PKH-26 adalah penanda sel yang mewarnai membran sel sehingga terlihat berpendar merah ketika diamati dengan mikroskop fluoresens yang dilengkapi filter merah (Gambar 1). Suspensi sel testikular dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL. Diluen sebanyak tiga kali volume sel dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi suspensi sel. Pewarna PKH-26 dimasukkan sebanyak 3 μL dan diinkubasi selama sepuluh menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi sebanyak dua kali, setelah itu supernatannya dibuang. Natan



Gambar 1. Pewarnaan suspensi sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* dengan PKH 26. Keterangan: (a) Suspensi sel yang diamati tanpa fluoresensi; (b) Suspensi sel yang diamati dengan fluoresensi. Tanda panah adalah sel spermatogonia yang terwarnai PKH 26.

berupa endapan sel testikular di dalam tabung mikro selanjutnya dilarutkan kembali dengan larutan PBS sesuai volume awal.

Transplantasi sel dilakukan menggunakan mikroinjektor (Narishige, Jepang) dan mikroskop stereo Stemi DV4 (Zeiss, German). Jarum mikroinjeksi berdiameter 30 µm dipasang pada *needle holder*, dan diisi dengan minyak mineral. Selanjutnya sel testikular hasil disosiasi diambil menggunakan mikropipet sebanyak 0,5 µL dan dikeluarkan di atas parafilm. *Needle holder* yang terhubung dengan jarum mikroinjeksi dilepaskan dari mikromanipulator dan suspensi sel yang terdapat di parafilm dimasukkan ke dalam jarum mikroinjeksi dengan cara disedot langsung dengan jarum mikroinjeksi yang telah terhubung dengan mikromanipulator.

Ikan resipien masing-masing sebanyak 75 ekor larva berumur 10 HSM ditransplantasi dengan sel testikular dari setiap kelompok ukuran donor menggunakan dosis 10.000 sel donor/ekor ikan. Donor yang digunakan berasal dari kelompok ukuran M dan kelompok ukuran L. Larva dipingsankan dengan air dingin dengan suhu sekitar 10 °C dan diletakkan pada tatakan agarosa 2%. Sel diinjeksikan pada rongga peritoneal larva menggunakan jarum mikroinjeksi yang digerakkan secara manual dengan mikromanipulator.

Benih ikan mas dipelihara lebih lanjut dalam akuarium berukuran 60×50×50 cm³ sampai berumur 60 hari setelah transplantasi (HST). Ikan hasil injeksi diberi pakan berupa cacing sutera secara *ad libitum* selama dua minggu. Selanjutnya, jenis pakan yang diberikan adalah pakan komersial berbentuk pelet dengan kadar protein 38%. Pakan komersial diberikan secara

at satiation dengan frekuensi dua kali dalam sehari. Pengelolaan kualitas air dilakukan dengan penyifonan air sebanyak satu kali dalam sehari dan penggantian air sebanyak 80% dari total volume air pemeliharaan setiap tiga hari.

Deteksi kolonisasi sel testikular

Deteksi sel testikular ikan donor dilakukan pada hari ketujuh dan 14 pascainjeksi dengan mengambil masing-masing sepuluh ekor sampel. Kolonisasi sel testikular ikan donor dideteksi menggunakan mikroskop Olympus BH-2 (Olympus, Jepang) yang dilengkapi fluoresens dan filter merah dengan perbesaran 100 kali. Sel testikular yang diinjeksikan terlihat berpendar merah karena telah ditandai dengan PKH-26. Sel yang berhasil mengalami kolonisasi akan terlihat berkumpul sepanjang *genital ridge*. Kelangsungan hidup larva juga diamati sampai hari ke-14 setelah injeksi untuk mengetahui tingkat ketahanan larva terhadap injeksi.

Analisis data

Parameter yang diamati meliputi perkembangan dan morfologi sel testikular, indeks kematangan gonad (IKG), proporsi sel testikular, serta keberhasilan transplantasi. Perkembangan dan morfologi sel testikular ditentukan berdasarkan gambaran histologi, diameter serta volume sel. Indeks kematangan gonad dianalisis berdasarkan hubungan antara bobot ikan dan bobot gonad. Sementara keberhasilan transplantasi ditentukan dari persentase kolonisasi sel ikan donor di dalam tubuh resipien dan kelangsungan hidup resipien. Seluruh data yang diperoleh, diolah menggunakan perangkat lunak *Microsoft Excel 2007* dan dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Karakteristik morfologi sel testikular ikan neon tetra

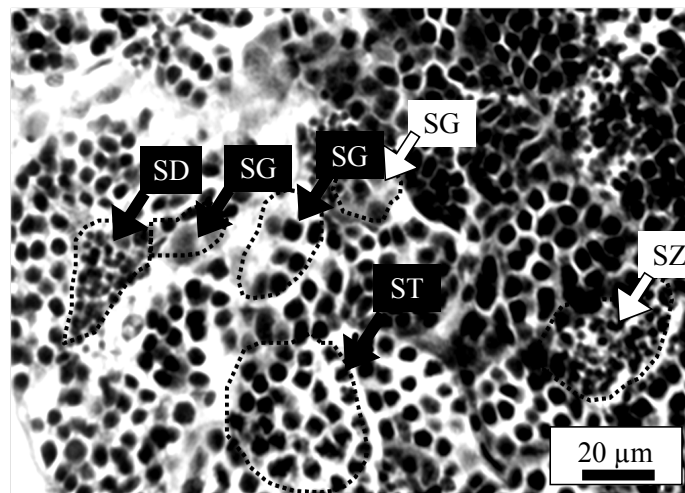
Hasil histologi menunjukkan adanya beberapa tipe sel testikular pada testis ikan neon tetra, yaitu spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa. Perbedaan karakteristik tipe sel testikular dapat terlihat dari ukuran dan jumlah sel yang terdapat dalam satu kista. Gambaran mengenai tipe sel testikular yang terdapat pada testis ikan neon disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil pengamatan gambaran histologi testis ikan neon tetra (Gambar 2), terdapat perbedaan karakter ukuran diameter dan volume sel untuk setiap tipe sel testikular yang teridentifikasi. Urutan ukuran sel testikular dari yang terbesar hingga yang terkecil adalah spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa. Ukuran diameter dan volume sel untuk setiap tipe sel testikular yang teridentifikasi dapat dilihat pada Tabel 1. Gambaran histologi testis setiap kelompok ukuran ikan neon tetra menunjukkan proporsi sel testikular yang berbeda (Gambar 3). Perbedaan tersebut terlihat dari fase spermatogenesis yang terjadi dan komposisi dari

setiap tipe sel testikular. Fase spermatogenesis yang dominan terjadi pada kelompok ukuran S adalah spermatositogenesis. Pada fase ini, tipe sel testikular yang teramati didominasi oleh spermatogonia dan spermatosit sementara jumlah spermatid dan spermatozoa relatif sedikit. Fase spermatogenesis yang dominan terjadi pada kelompok ukuran M adalah miogenesis. Gambaran histologi kelompok ukuran ini ditandai dengan komposisi spermatogonia mulai menurun sementara komposisi spermatosit, spermatid, dan spermatozoa terlihat meningkat. Sementara pada kelompok ukuran L, fase spermatogenesis yang mendominasi adalah spermiogenesis. Semua tipe sel testikular masih dapat teramati, meskipun demikian spermatozoa terlihat mendominasi komposisi sel testikular yang terdapat dalam testis.

Indeks kematangan gonad ikan neon tetra

Bobot gonad pada setiap kelompok ukuran ikan neon tetra menunjukkan kondisi yang berbeda (Gambar 4). Nilai rerata bobot gonad tertinggi terdapat pada kelompok ukuran L, sedangkan nilai rerata bobot gonad terendah adalah pada kelompok ukuran S, sementara nilai

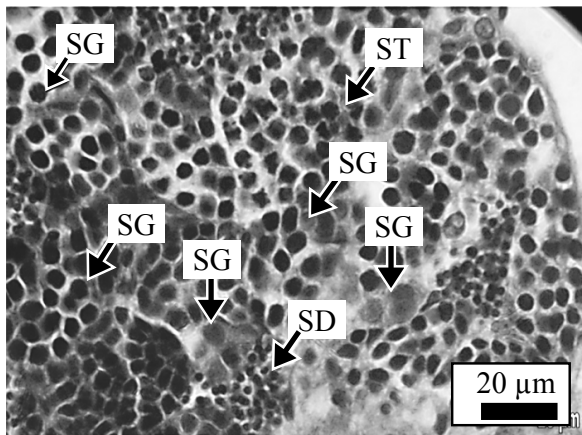


Gambar 2. Hasil histologi testis ikan neon tetra *Paracheirodon innesi*: spermatogonia (SG), spermatosit (ST), spermatid (SD), dan spermatozoa (SZ).

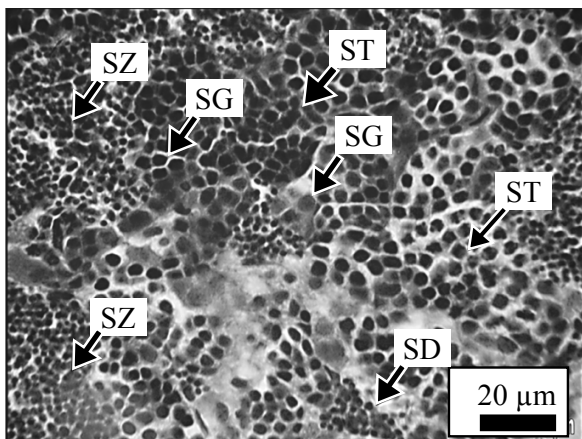
Tabel 1. Kisaran diameter, rerata diameter, serta rerata volume pada berbagai tipe sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi*

Tipe sel testikular	Karakter ukuran		
	Kisaran diameter (µm)	Rerata diameter (µm)	Rerata volume (µm ³)
Spermatogonia	5,0–10,0	6,75±1,28	177,57±96,02
Spermatosit	3,0–5,0	3,95±0,60	34,27±15,48
Spermatid	1,5–3,0	2,70±0,26	10,56±3,07
Spermatozoa	1,5–2,0	1,80±0,26	3,21±1,25

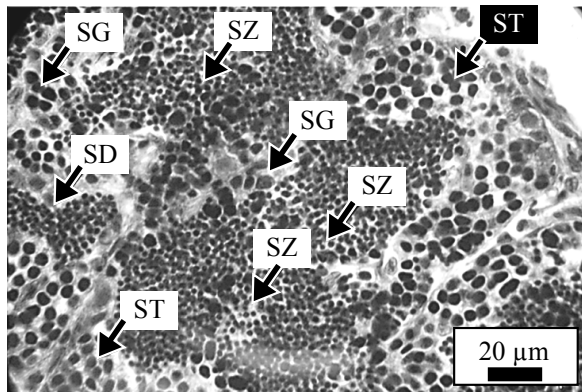
Keterangan: khusus untuk spermatozoa, ukuran yang tercantum merupakan hasil pengukuran terhadap bagian kepala sperma.



(a)



(b)

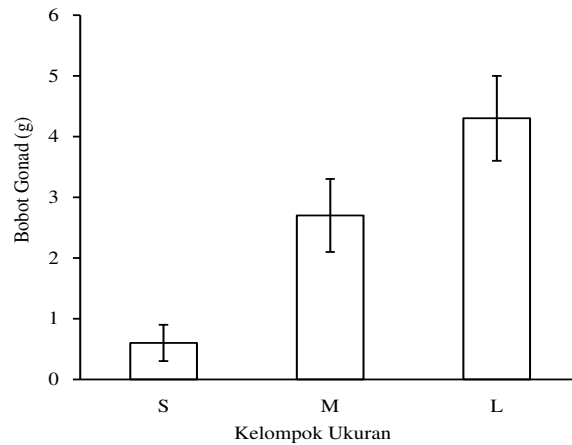


(c)

Gambar 3. Gambaran histologi testis ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* dari berbagai kelompok ukuran. Gambar kiri atas: ikan berukuran S (PT<18,00 mm); kanan atas: ikan ukuran M (PT=18,00–23,00 mm); bawah: ikan berukuran L (PT>23,00 mm). SG: spermatogonia, ST: spermatisit, SD: spermatid, dan SZ: spermatozoa.

rerata bobot gonad untuk kelompok ukuran M berada di antara kelompok L dan S.

Data bobot gonad dan bobot ikan telah diplotkan dalam diagram pencar (Gambar 5) dan menunjukkan bahwa kedua peubah saling berhubungan secara linear sehingga membentuk garis regresi linear yang memenuhi persamaan



Gambar 4. Bobot gonad ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* kelompok ukuran S (PT<18,00 mm), ukuran M (PT=18,00–23,00 mm), dan ukuran L (PT>23,00 mm).

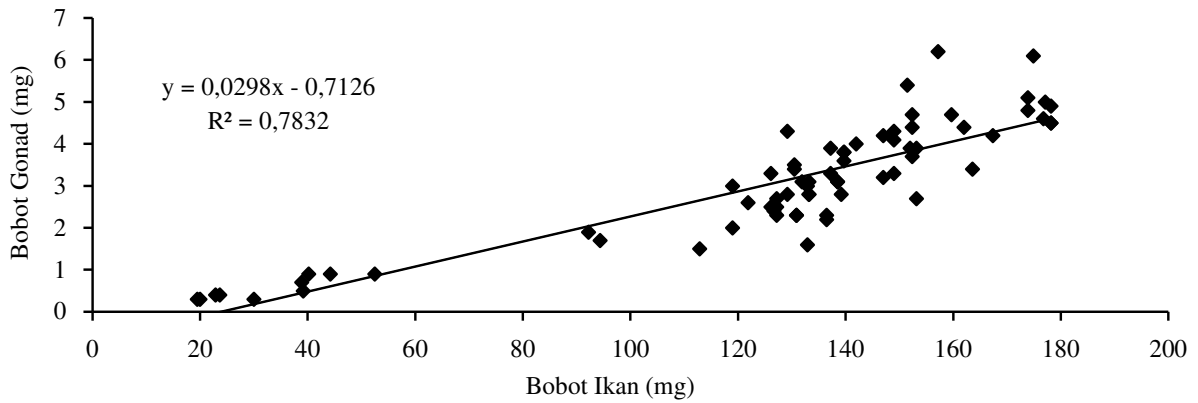
$y=0,0298x-0,0007$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,8850 dan koefisien determinasi (r^2) sebesar 0,7832. Dengan demikian, dapat diartikan bahwa terdapat hubungan linear yang sangat kuat antara bobot ikan dan bobot gonad, yaitu terdapat kecenderungan peningkatan bobot ikan disertai dengan bertambahnya bobot gonad.

Ditinjau dari parameter IKG, diketahui bahwa setiap kelompok ukuran ikan neon tetra memiliki nilai IKG yang berbeda (Gambar 6). Rerata nilai IKG tertinggi terdapat pada kelompok ukuran L, sedangkan rerata nilai IKG terendah adalah pada kelompok ukuran S, sementara untuk kelompok ukuran M berada antara kelompok L dan S.

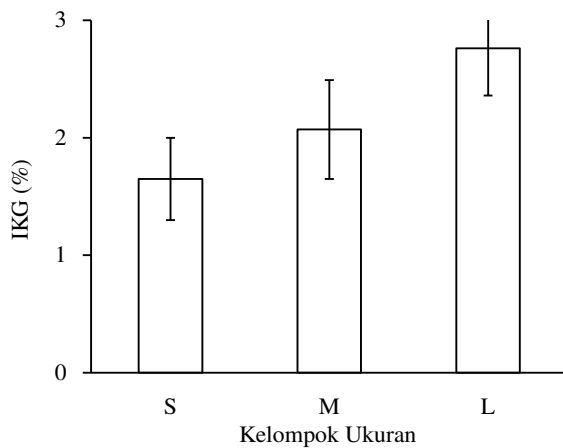
Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa hubungan IKG dengan bobot ikan mengikuti persamaan $y=8,2599x+1,2557$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,6140 (Gambar 7). Dengan demikian dapat diartikan bahwa terdapat hubungan linear yang kuat antara bobot ikan dan IKG, yaitu terdapat kecenderungan peningkatan bobot ikan disertai dengan bertambahnya IKG.

Proporsi sel testikular ikan neon tetra

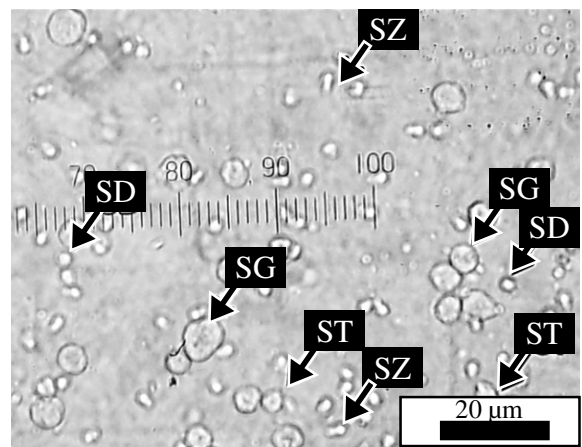
Berdasarkan kriteria ukuran sel testikular ikan neon tetra yang terdapat pada Tabel 1, jumlah total sel testikular dan jumlah masing-masing tipe sel testikular hasil disosiasi testis ikan neon tetra (Gambar 8), memperlihatkan hasil yang berbeda antar kelompok ukuran (Tabel 2). Rerata total sel testikular pada kelompok ukuran M adalah 627.111 ± 8.804 sel/mg gonad yang terdiri atas spermatogonia dengan rerata jumlah 136.444 ± 6.281 sel/mg gonad, spermatisit dengan rerata jumlah 286.148 ± 10.090 sel/mg gonad, serta spermatid dengan rerata jumlah 204.518 ± 12.408 sel/mg gonad. Sementara pada



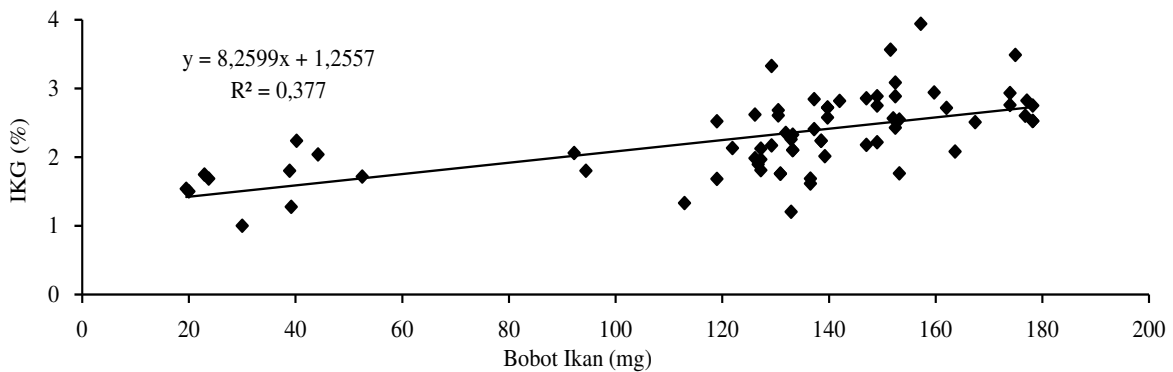
Gambar 5. Grafik hubungan linear antara bobot ikan dengan bobot gonad pada ikan neon tetra *Paracheiroidon innesi*.



Gambar 6. Indeks kematangan gonad (IKG) ikan neon tetra *Paracheiroidon innesi* pada kelompok ukuran S (PT < 18,00 mm), ukuran M (PT = 18,00–23,00 mm), dan ukuran L (PT > 23,00 mm).



Gambar 8. Sel testikular ikan neon tetra *Paracheiroidon innesi* hasil disosiasi menggunakan tripsin 0,5%. (SG) spermatogonia, (ST) spermatosit, (SD) spermatid, dan (SZ) spermatozoa.



Gambar 7. Grafik hubungan linear antara bobot ikan dengan indeks kematangan gonad (IKG) pada ikan neon tetra *Paracheiroidon innesi*.

kelompok ukuran L rerata total sel testikular adalah 730.627 ± 21.187 sel/mg gonad yang terdiri atas spermatogonia dengan rerata jumlah 35.023 ± 2.282 sel/mg gonad, spermatosit dengan rerata jumlah 404.148 ± 11.006 sel/mg gonad, dan spermatid dengan rerata jumlah 705.666 ± 38.149 sel/mg gonad.

Perbedaan jumlah total dan jumlah masing-masing tipe sel testikular yang berbeda untuk

setiap kelompok ukuran berpengaruh terhadap proporsi spermatogonia pada setiap kelompok ukuran donor. Berdasarkan Tabel 2, terdapat kecenderungan penurunan jumlah dan proporsi spermatogonia seiring dengan bertambahnya ukuran ikan. Kelompok ukuran M memiliki proporsi spermatogonia yang lebih tinggi ($20,95 \pm 1,29\%$) dibandingkan dengan kelompok ukuran L ($6,85 \pm 0,54\%$).

Tabel 2. Jumlah sel testikular, spermatogonia, spermatosit, dan spermatid serta proporsi spermatogonia pada berbagai kelompok ukuran ikan neon tetra *Paracheirodon innesi*.

Parameter	Kelompok ukuran (panjang total)		
	S (PT<18,00 mm)	M (PT=18,00–23,00 mm)	L (PT>23,00 mm)
Sel testikular (sel/mg gonad)	NA	627.111±8.804	730.627±21.187
Spermatogonia (sel/mg gonad)	NA	136.444±6.281	35.023±2.282
Spermatosit (sel/mg gonad)	NA	286.148±10.090	404.148±11.006
Spermatid (sel/mg gonad)	NA	204.518±12.408	705.666±38.149
Proporsi spermatogonia (%)	NA	20.95±1,29	6,85±0,54

Keterangan: S (*small*), M (*medium*), dan L (*large*); kelompok ukuran S tidak bisa diambil gonadnya secara utuh sehingga semua parameter tidak dapat diamati (NA).

Kolonisasi sel testikular ikan neon tetra

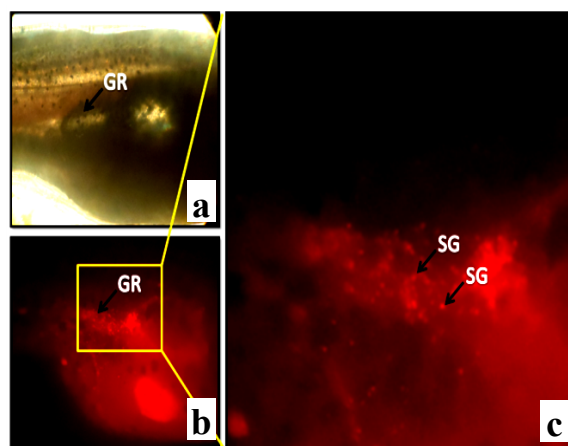
Berdasarkan hasil pengamatan pada hari ke-14 setelah injeksi yang dilakukan terhadap 75 larva ikan mas untuk setiap kelompok ukuran donor, kelangsungan hidup larva yang diinjeksi dengan sel testikular dari kelompok ukuran M lebih tinggi dibandingkan kelangsungan hidup larva yang diinjeksi dengan sel testikular dari kelompok ukuran L. Sementara itu, berdasarkan hasil pengamatan keberhasilan kolonisasi dengan mikroskop fluoresensi, persentase keberhasilan kolonisasi sel testikular dari donor kelompok ukuran M juga relatif lebih tinggi dibandingkan dengan donor kelompok L (Tabel 3).

Pengamatan kolonisasi sel testikular ikan neon tetra di dalam larva ikan mas dilakukan pada hari ketujuh dan 14 setelah injeksi terhadap 20 sampel larva untuk setiap kelompok umur donor. Pendaran merah PKH-26 di dalam tubuh larva yang diamati dengan mikroskop fluoresensi menunjukkan sel testikular berhasil masuk ke dalam tubuh larva ikan mas. Spermatogonia *viable* yang mengandung PKH-26 akan bergerak menuju *genital ridge* dan berhasil mengalami kolonisasi. Dengan demikian, keberhasilan kolonisasi ditandai dengan terdapatnya kelompok sel yang berpendar merah di sekitar *genital ridge* (Gambar 9).

PEMBAHASAN

Aplikasi teknologi transplantasi sel germinal berpotensi mengatasi permasalahan ketersediaan

benih ikan neon tetra. Teknologi ini dilakukan dengan cara mentransplantasikan sel germinal ke dalam rongga perut larva ikan resipien, selanjutnya sel donor berdiferensiasi menjadi telur atau sperma ikan donor di dalam tubuh ikan resipien. Mengacu kepada Okutsu *et al.* (2006b), spermatogonia merupakan materi alternatif untuk menggantikan penggunaan PGC yang memiliki kelimpahan terbatas. Hal tersebut terutama karena spermatogonia dapat ditemukan dalam jumlah yang relatif besar pada semua tahapan perkembangan testis. Selain itu, Okutsu *et al.* (2006a), melaporkan bahwa kelompok



Gambar 9. Kolonisasi sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* pada benih ikan mas *Cyprinus carpio* hari ke-14 pascatransplantasi. (a) bagian *genital ridge* ikan mas *C. carpio* diamati dengan mikroskop cahaya tanpa fluoresensi; (b) bagian *genital ridge* ikan mas *C. carpio* diamati dengan fluoresensi; (c) spermatogonia (SG) yang berhasil terkolonisasi pada *genital ridge* (GR).

Tabel 3. Keberhasilan kolonisasi dan kelangsungan hidup benih ikan mas *Cyprinus carpio* yang ditransplantasi sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* kelompok ukuran M dan L

Sumber sel testikular ikan	Kelangsungan hidup (%)	Keberhasilan kolonisasi (%)
Ikan neon tetra ukuran M (PT=18,00–23,00 mm)	38,75	85,00±7,07
Ikan neon tetra ukuran L (PT>23,00 mm)	30,00	75,00±7,07

Keterangan: khusus untuk spermatozoa, ukuran yang tercantum merupakan hasil pengukuran terhadap bagian kepala sperma.

spermatogonia tertentu merupakan sel yang memiliki keistimewaan dengan karakteristik menyerupai PGC atau sel punca dengan tingkat *development plasticity* yang tinggi sehingga dapat berkembang tidak hanya menjadi sel spermatozoa tetapi juga dapat berkembang menjadi oosit.

Metode isolasi spermatogonia yang tepat diperlukan untuk memperoleh spermatogonia dalam jumlah dan kemurnian yang tinggi. Metode isolasi spermatogonia secara *flow-cytometric* pada ikan dengan menggunakan penanda sel spesifik *green fluorescent protein*, telah dilakukan pada ikan *rainbow trout* oleh Yano *et al.* (2008). Pendekatan lain yang lebih aplikatif dibuat dengan berdasarkan sifat biofisik sel. Salah satu metode yang umum digunakan adalah pemisahan sel spermatogonia dari sel testikular lainnya dengan metode *percoll gradient density* seperti yang dilakukan pada ikan nila (Lacerda *et al.*, 2008).

Pendekatan lain yang lebih sederhana adalah dengan cara mencari tahap perkembangan gonad berdasarkan bobot tubuh yang memiliki kelimpahan spermatogonia yang maksimum. Metode ini telah diterapkan oleh Takeuchi *et al.* (2009) dalam transplantasi sel testikular ikan nibe. Syarat utama untuk menerapkan metode tersebut adalah diketahuinya informasi mengenai karakteristik morfologi dan proporsi sel testikular. Informasi tersebut diperlukan untuk menentukan ukuran dan indeks kematangan gonad (IKG) donor yang memiliki proporsi spermatogonia tertinggi.

Informasi mengenai karakteristik morfologi dan proporsi sel testikular ikan neon tetra belum pernah dilaporkan. Pada penelitian ini, karakterisasi morfologi sel testikular ikan neon tetra dilakukan menggunakan gambaran histologi testis. Berdasarkan gambaran histologi testis ikan neon tetra (Gambar 2) diketahui bahwa karakter diameter sel dan volume sel berbeda untuk setiap tipe sel testikular yang teridentifikasi. Urutan ukuran sel testikular dari yang terbesar hingga yang terkecil adalah spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa (Tabel 1).

Berdasarkan gambaran histologi testis ikan neon tetra (Gambar 3) komposisi spermatogonia, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa berbeda untuk setiap kelompok ukuran. Perbedaan tersebut terlihat dari fase spermatogenesis yang terjadi dan komposisi dari setiap tipe sel testikular pada setiap kelompok ukuran. Berdasarkan klasifikasi Fox (2010), sistem reproduksi pada ikan dapat diklasifikasikan menurut gambaran histologi gonad menjadi enam kelompok yaitu

belum matang (*immature*), perkembangan (*developing*), mampu memijah (*spawning capable*), aktif memijah (*actively spawning*), kemunduran (*regressing*), dan pembentukan kembali (*regenerating*).

Mengacu kepada klasifikasi Fox (2010), gambaran histologi yang diperoleh dari kelompok ukuran S diduga mengarah kepada fase *developing*, dengan ciri terjadinya inisiasi spermatogenesis dan terbentuknya formasi spermatokist. Selain itu spermatogonia primer, spermatogonia sekunder, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa dapat ditemukan pada spermatokist. Spermatozoa belum terlihat pada lobul maupun *sperm ducts*. Gambaran histologi yang diperoleh dari kelompok ukuran M diduga mengarah kepada fase *spawning capable* dengan ciri utama spermatozoa mulai terkonsentrasi pada lobul atau *sperm ducts*, semua fase spermatogenesis (spermatogonia, spermatosit, dan spermatid) dapat ditemukan, dan spermatokist tersebar di seluruh bagian testis. Sementara kelompok ukuran L diduga berada pada fase *actively spawning*. Secara histologi, ciri histologi pada fase tersebut relatif sama dengan fase *spawning capable*, meskipun demikian terdapat konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi pada lobul atau *spermducts*.

Fase perkembangan gonad yang berbeda untuk setiap kelompok ukuran, juga disertai dengan perbedaan bobot gonad (Gambar 4) dan IKG (Gambar 6). Berdasarkan analisis regresi linear, bobot ikan dan bobot gonad memiliki hubungan linear yang sangat kuat, dengan kecenderungan peningkatan bobot ikan disertai dengan bertambahnya bobot gonad (Gambar 5). Hubungan linear yang kuat juga terdapat antara bobot ikan dan IKG, dengan kecenderungan peningkatan bobot ikan akan menyebabkan bertambahnya IKG (Gambar 7). Peningkatan IKG seiring dengan bertambahnya panjang dan bobot ikan disebabkan adanya proses perkembangan gonad yang terjadi bersamaan dengan pertumbuhan somatik. Nilai IKG cenderung semakin meningkat dan mencapai batas maksimum ketika ikan telah dewasa dan siap memijah. Analisis lebih lanjut mengenai hubungan antara nilai IKG dan ukuran ikan terhadap jumlah dan persentase spermatogonia terhadap tipe sel testikular lainnya, menunjukkan pola hubungan yang cenderung berbanding terbalik. Semakin tinggi nilai IKG dan ukuran ikan, cenderung disertai dengan penurunan jumlah dan persentase spermatogonia terhadap tipe sel testikular lainnya. Hal tersebut sesuai

dengan data pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa proporsi spermatogonia pada kelompok M lebih besar dibandingkan kelompok L. Sementara untuk kelompok ukuran S, jumlah, dan persentase spermatogonia tidak dapat dihitung akibat faktor teknis berupa kesulitan untuk mengambil gonad secara utuh karena ukuran gonad yang terlampau kecil.

Farlora *et al.* (2009) menyatakan bahwa persyaratan untuk menjadi donor dalam transplantasi adalah jumlah spermatogonia tidak terdiferensiasi melimpah dan jumlah relatif sel testikular lainnya khususnya yang telah mengalami tahap meiosis serta sel–sel somatik sedikit. Terkait dengan pernyataan tersebut, analisis keberhasilan kolonisasi sel testikular perlu dilakukan untuk mengkaji pengaruh komposisi spermatogonia dalam sel testikular dari kedua kelompok ukuran terhadap terjadinya kolonisasi sel donor pada resipien. Berdasarkan hasil pengamatan pada hari ketujuh dan 14 setelah injeksi yang dilakukan terhadap 20 sampel larva ikan mas untuk setiap kelompok ukuran donor diperoleh data yang tercantum pada Tabel 3. Persentase keberhasilan kolonisasi sel testikular dari kelompok ukuran donor M adalah sebesar $85,00 \pm 7,07\%$, lebih tinggi dibandingkan dengan keberhasilan kolonisasi sel testikular dari kelompok donor L sebesar $75,00 \pm 7,07\%$.

Raz (2004) menyatakan bahwa kolonisasi terjadi ketika SSC yang diinjeksi pada rongga peritoneal larva bermigrasi ke *genital ridge* dengan gerakan kemotaksis oleh pseudopia. Semakin banyak jumlah dan proporsi spermatogonia maka keberhasilan kolonisasi cenderung meningkat. Sesuai dengan pendapat Sofikitis *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa semakin banyak jumlah spermatogonia tidak terdiferensiasi maka peluang terkolonisasinya sel donor pada gonad resipien semakin besar. Sebaliknya, sel testikular lainnya terutama spermatozoa dan sel–sel somatis lain sebaiknya dalam jumlah sedikit karena kedua tipe sel ini menjadikan larutan disosiasi memiliki viskositas tinggi sehingga proses injeksi akan terganggu (Farlora *et al.*, 2009).

Proses kolonisasi sel donor pada gonad resipien diawali dengan proses migrasi sel donor ke jaringan bakal gonad (*genital ridge*) dari ikan resipien. Menurut Yoshizaki (2010) proses migrasi PGC pada ikan *rainbow trout* berlangsung sesuai dengan mekanisme yang dilaporkan oleh Yoshizaki (2010). Mekanisme tersebut diawali dengan diskresikannya *chemokine stromal derived factor-1* (SDF-1)

oleh sel somatik bakal gonad resipien, kemudian PGC (sel donor) yang terletak di luar bakal gonad tersebut mengekspresikan reseptor yaitu *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR-4), selanjutnya PGC akan mengarah ke SDF-1 dan bermigrasi ke bakal gonad menggunakan *pseudopodia*. Setelah mencapai daerah bakal gonad, PGC mengalami penggabungan (terkolonisasi) dengan gonad resipien. Keberhasilan kolonisasi sel testikular ikan neon tetra pada larva ikan mas sebagai resipien, mengindikasikan adanya kesesuaian antara *chemokine stromal derived factor-1* (SDF-1) ikan mas dengan *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR-4) dari ikan neon.

Meskipun tingkat keberhasilan kolonisasi sel testikular ikan neon tetra pada larva ikan mas sebagai resipien yang diperoleh dalam penelitian ini relatif tinggi, kelangsungan hidup resipien relatif rendah (Tabel 3). Kelangsungan hidup larva resipien yang diinjeksi dengan sel testikular dari kelompok ukuran donor M adalah sebesar 38,75%, sementara kelangsungan hidup larva resipien yang diinjeksi dengan sel testikular dari kelompok ukuran donor L adalah sebesar 30%. Rendahnya kelangsungan hidup dapat dipengaruhi oleh faktor teknis.

Selain dipengaruhi oleh jumlah spermatogonia dalam suspensi sel testikular yang diinjeksikan, kesesuaian antara SDF-1 ikan mas dengan CXCR-4 dari ikan neon, serta faktor teknis penyuntikan, keberhasilan kolonisasi dan kelangsungan hidup yang diperoleh dalam penelitian dapat dipengaruhi oleh umur larva yang digunakan. Meskipun penentuan umur resipien yang optimum bukan merupakan fokus dalam penelitian ini, diduga bahwa umur resipien memiliki pengaruh terkait dengan ukuran dan perkembangan sistem imun.

Pengaruh ukuran terhadap keberhasilan transplantasi telah dilaporkan oleh Takeuchi *et al.* (2009) pada transplantasi sel spermatogonia ikan nibe, resipien yang berukuran lebih kecil diketahui memiliki tingkat kelangsungan hidup yang lebih kecil, hal ini diperlihatkan dengan menurunnya kelangsungan hidup larva dari 63,3% (pada resipien berukuran 6 mm) menjadi 2,9% (pada resipien berukuran 3 mm). Pada beberapa jenis ikan dapat terjadi *allograft rejection* (penolakan transplantasi jaringan atau organ dari individu lain dari spesies yang sama oleh sistem imun) setelah umur tertentu (Nankivell & Alexander, 2010). Larva yang digunakan dalam penelitian ini berumur 10 HSM dengan pertimbangan bahwa sistem imun belum terbentuk sempurna dan ukuran yang relatif besar. Meskipun demikian,

berdasarkan beberapa hasil penelitian yang telah diuraikan, keterkaitan antara umur larva dengan keberhasilan kolonisasi dan kelangsungan hidup perlu diteliti pada penelitian selanjutnya.

KESIMPULAN

Spermatogonia ikan neon tetra memiliki rerata diameter sel $6,75 \pm 1,28 \mu\text{m}$ dan volume sel $177,57 \pm 96,02 \mu\text{m}^3$. Sel testikular ikan neon tetra yang ditransplantasikan telah berhasil terkolonisasi pada *genital ridge* ikan mas. Kelompok ikan neon tetra ukuran *medium* (M) memiliki proporsi spermatogonia ($20,95 \pm 1,29\%$) dan tingkat kolonisasi sel testikular ($85,00 \pm 7,07\%$) tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alderton D. 2005. Encyclopedia of Aquarium and Pond Fish. New York, USA: DK Publication Inc.
- Budiardi T, Gemawaty N, Wahjuningrum D. 2007. Produksi ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* ukuran L pada padat tebar 20, 40, dan 60 ekor/liter dalam sistem resirkulasi. Jurnal Akuakultur Indonesia 6: 211–215.
- Farlora R, Kobayashi S, França LR, Batlouni SR, Lacerda SMSN, Yoshizaki G. 2009. Expression of GFP in transgenic tilapia under the control of the medaka β -actin promoter: establishment of a model system for germ cell transplantation. Animal Reproduction 6: 450–459.
- Fox CN. 2010. Seasonal abundance, age structure, gonadosomatic index, and gonad histology of yellow bass *Morone mississippiensis* in the upper Barataria Estuary, Louisiana [Tesis]. Thibodaux, Louisiana, USA: Graduate Faculty of Nicholls State University.
- Imanpour MR, Enayat GT. 2009. The effects of broodstock age on some biological characters of wild common carp *Cyprinus carpio* eggs in Gorganrood River. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 16: unpaginated.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Assis LH, Resende FM, Campos-Silva SM, Campos-Silva R, Segatelli TM, França LR. 2008. Germ cell transplantation in tilapia *Oreochromis niloticus*. Cybium 32: 115–118.
- Majhi SK, Hattori RS, Yokota M, Watanabe S, Strussmann CA. 2009. Germ cell transplantation using sexually competent fish: an approach for rapid propagation of endangered and valuable germline. Tokyo, Japan: Department of Marine Bioscience, Tokyo University of Marine Science and Technology.
- McAnulty PA, Dayan AD, Ganderup NC, Hastings KL. 2012. The Minipid in Biomedical Research. USA: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Nankivell BJ, Alexander SI. 2010. Rejection of the kidney allograft. The New England Journal of Medicine 363: 1.451–1.462.
- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. Science 317: 15–17.
- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Takeuchi T, Yoshizaki G, 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. Proceedings of National Academy of Sciences USA 103: 2.725–2.729.
- Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, Shikina S, Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. Journal of Reproduction and Development 52: 685.
- Quintana L, Silva A, Berois N, Macadar O. 2004. Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhyppopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. The Journal of Experimental Biology 207: 1.843–1.853.
- Raz E. 2004. Guidance of primordial germ cell migration. Current Opinion of Cellular Biology 16: 169–173.
- Saputro A, Farmayanti N, Diatin I. 2007. Analisis strategi bisnis ikanhias air tawar (kasus di PT NAE Jakarta). Buletin Ekonomi Perikanan 7: 50–63.
- Saxby A, Adams L, Snellgrove D, Wilson RW, Sloman KA. 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. Applied Animal Behaviour Science 125: 195–205.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsonapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 109: 323–330.
- Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, Miwa M, Yoshizaki G. 2009. Development of spermatogonia cell transplantation in nibe

- croaker *Nibe mitsukurii* *Perciformes, Sciaenidae*. *Biology of Reproduction* 81: 1.055–1.063.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction* 69: 1.142–1.149.
- Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G. 2008. Flow–cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biology of Reproduction* 78: 151–158.
- Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y. 2010. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Animal Reproduction* 7: 187–196.