

Elektroporasi dan transplantasi sel testikular dengan label GFP pada ikan nila

Electroporation and GFP-labelled transplantation of testicular cells in Nile tilapia

Epro Barades¹, Alimuddin^{2*}, Agus Oman Sudrajat²

¹Program Studi Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan, Politeknik Negeri Lampung
Jalan Soekarno Hatta no 10, Rajabasa, Lampung 35141

²Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680

*Surel: alimuddin_alsani@yahoo.com

ABSTRACT

Transplantation technology can be applied to generate fish surrogate broodstock. A donor germinal cells that was used in transplantation are labeled to distinguish it with endogenous cells. Donor cells are generally derived from transgenic fish carrying a marker or cells labeled by PKH-26. This study was performed to obtain an alternative method of cell labelling using electroporation. Testicular cells were taken from 4-months old Nile tilapia as a model. Electroporation was performed with testicular cell density of 10^4 cells/ μL , pJfKer-GFP concentration of 50 ng/ μL , and a pulse length of 20 ms at 0, 100, 200, and 300 volts. At amount of 5×10^3 cells/ $0.5 \mu\text{L}$ electroporated testicular cells were then injected into the intraperitoneal cavity of 3-day-old Nile tilapia larva. The results showed that survival of the electroporated cells of 100 and 200 volt-treatments was similar ($P > 0.05$), and higher than 300 volt ($P < 0.05$). Number of fluorescent cells was not significantly different among treatments. The highest cell colonization in transplanted fish was obtained in 200-volt treatment (66.67%). As conclusion, 200-volt electroporation with was a suitable tool to label testicular cells for transplantation.

Keyword: electroporation, GFP, label, Nile tilapia, transplantation

ABSTRAK

Teknologi transplantasi merupakan suatu teknologi yang dapat menghasilkan induk pengganti. Sel donor berupa sel germinal yang akan digunakan dalam transplantasi diberi label agar dapat dibedakan dengan sel resipien. Umumnya sel donor diperoleh dari ikan transgenik yang membawa marka atau diwarnai dengan PKH-26. Penelitian ini bertujuan untuk mencari metode alternatif dalam pemberian label pada sel dengan elektroporasi. Sel testikular diperoleh dari ikan nila berumur empat bulan sebagai model. Elektroporasi dilakukan dengan kepadatan sel 10^4 sel/ μL , konsentrasi pJfKer-GFP 50 ng/ μL , dan panjang kejutan 20 ms pada 0, 100, 200, dan 300 volt. Sebanyak 5×10^3 sel dalam $0,5 \mu\text{L}$ larutan hasil elektroporasi disuntikkan ke dalam rongga intraperitoneal larva berumur tiga hari setelah menetas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelangsungan hidup sel pada kejutan 100 dan 200 volt tidak signifikan ($P < 0,05$), akan tetapi lebih tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan 300 volt ($P < 0,05$). Jumlah sel yang berpendar tidak berbeda antara perlakuan. Persentase kolonisasi sel pada ikan hasil transplan tertinggi pada perlakuan 200 volt (66,67%). Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian adalah perlakuan elektroporasi dengan kejutan listrik 200 volt dapat digunakan untuk memberi label pada sel testikular yang akan ditransplantasikan.

Kata kunci : elektroporasi, GFP, label, ikan nila, transplantasi

PENDAHULUAN

Transplantasi sel germinal merupakan salah satu teknologi yang sedang dikembangkan dalam bidang perikanan untuk menghasilkan induk semang (*surrogate broodstock*), berpotensi digunakan dalam rekayasa produksi benih ikan dan mempertahankan ikan-ikan yang terancam

punah (Achmad *et al.*, 2009; Farlora *et al.*, 2009). Pengembangan teknologi transplantasi sel germinal pada ikan diawali pada ikan *rainbow trout* (*Onchorhynchus mykiss*) (Okutsu *et al.*, 2007; Yoshizaki *et al.*, 2010), dan telur ikan *rainbow trout* berhasil diperoleh dari ikan *salmon masu* (*Onchorhynchus masou*) triploid steril yang telah ditransplantasi sel germinal ikan

rainbow trout. Penggunaan ikan resipien triploid dimaksudkan supaya ovum atau sperma yang dihasilkan semuanya berasal dari sel ikan donor (Okutsu *et al.*, 2007).

Keberhasilan transplantasi sel germinal donor pada ikan resipien sulit untuk diamati secara visual, karena morfologi sel donor dan resipien adalah sama. Sel donor umumnya diberi label sebelum ditransplantasikan. Label yang digunakan dapat berupa *red fluorescent cell linker kit* (PKH-26; Sigma) dan gen *green fluorescent protein* (GFP) (Yoshizaki *et al.*, 2005). PKH-26 merupakan bahan kimia yang dapat membuat sel berpendar merah dalam jangka waktu tertentu (Sigma). Sementara itu, sel berlabel GFP dapat diperoleh dari ikan transgenik yang membawa gen GFP (Okutsu *et al.*, 2007), atau dari *blastodisc embryo* yang disuntik dengan mRNA GFP (Yoshizaki *et al.*, 2005). Produksi ikan transgenik yang membawa gen GFP membutuhkan waktu relatif lama, sedangkan pelabelan sel melalui injeksi mRNA GFP ke embrio relatif lebih cepat daripada transgenik, tetapi biayanya relatif mahal. Selain itu, ikan yang dihasilkan melalui transplantasi sel dari embrio umumnya dalam bentuk kimera (Hong *et al.*, 2012)

Elektroporasi merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk memasukkan DNA asing ke dalam sel (Andre & Mir, 2004; Mir, 2008). Metode elektroporasi memanfaatkan kejutan listrik sehingga dinding sel akan terbuka sementara dan dapat dilewati oleh DNA asing (Mir *et al.*, 2005). Li *et al.* (2013) memasukkan plasmid DNA ke dalam sel sertoli tikus dengan cara elektroporasi dan lipofektamin. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode elektroporasi lebih efisien dibandingkan dengan lipofektamin. Keberhasilan ini memberikan harapan baru untuk mempersingkat proses transplantasi sel, dengan tidak menghasilkan ikan transgenik terlebih dahulu. Pada penelitian ini dilakukan transfer gen GFP menggunakan elektroporasi pada sel testikular ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan ditransplantasikan ke dalam rongga intraperitoneal ikan nila, sehingga diharapkan sel donor dan sel resipien mudah untuk dibedakan.

BAHAN DAN METODE

Persiapan resipien

Resipien yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva ikan nila yang berumur tiga hari setelah menetas. Tahap persiapan resipien

meliputi pemijahan induk ikan nila secara buatan, dan inkubasi telur hingga menetas menjadi larva dan siap digunakan untuk transplantasi. Proses pemijahan buatan ikan nila dilakukan setelah induk diinduksi secara alami. Induksi alami dilakukan dengan memasukkan masing-masing satu ekor induk nila betina (bobot 200–250 g) dan jantan (bobot 250–300 g) yang sudah matang kelamin dalam satu akuarium ukuran 50x60x40 cm³. Setiap pelaksanaan pemijahan dilakukan menggunakan 3–5 pasang induk. Saat kedua ikan akan menunjukkan perilaku pemijahan (genital induk jantan dan betina menonjol keluar serta membersihkan dasar akuarium secara bersama) dan pada saat inilah kedua induk tersebut diambil, dan gamet dikoleksi. Sperma dan telur dicampur di cawan dan kemudian ditambahkan air untuk induksi pemuahan.

Disosiasi sel

Testis yang digunakan sebagai sumber sel testikular adalah ikan nila umur sekitar empat bulan (bobot 104±35,8 g). Metode disosiasi sel dilakukan mengacu pada Firdaus *et al.* (2013).

Elektroporasi gen *green fluorescent protein* (GFP)

Transfer gen GFP ke dalam sel testikular dilakukan secara elektroporasi. Kepadatan sel testikular yang digunakan (10⁴ sel/μL) sesuai dengan Firdaus *et al.* (2013), dan vektor ekspresi pJfKer-GFP (Yazawa *et al.*, 2005) 50 ng/μL. Gen GFP yang digunakan membawa promotor keratin. Promotor keratin memberikan efektivitas yang lebih baik dibandingkan dengan promoter beta-aktin ikan medaka dan ikan nila dalam mengendalikan ekspresi GFP pada ikan nila.

Perlakuan voltase yang digunakan adalah sebesar 0, 100, 200, dan 300 volt, lama waktu kejutan 20 ms sebanyak satu kali kejutan dan tiga kali pengulangan. Data yang dikumpulkan berupa persentase sel hidup dan persentase sel yang membawa gen GFP. Penghitungan jumlah sel dilakukan menggunakan hemositometer dan mikroskop pada perbesaran 400 kali. Sel hidup dapat dilihat menggunakan pewarna eosin. Pewarna eosin akan mewarnai sel yang mati menjadi warna merah, sedangkan sel yang hidup tidak terwarnai. Kemudian penghitungan sel yang membawa gen GFP dilakukan dengan menggunakan mikroskop yang dilengkapi dengan filter GFP.

Konfirmasi keberhasilan transfer gen GFP ke sel juga dilakukan menggunakan metode PCR

dengan primer GFP *forward* (5'-GGTCGAGCTG GACGGCGACG-3') dan GFP *reverse* (5'-ACG AACTCCAGCAGGACCAT-3'). Hasil PCR diseparasi menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa 2%. Produk amplifikasi gen GFP berada pada ukuran sekitar 600 bp.

Teknik transplantasi

Proses transplantasi dilakukan menggunakan mikroinjektor dengan bantuan mikroskop stemi DV4 Zeiss. Kepadatan sel 10^4 sel/ μ L, volume sel yang disuntikkan ke dalam rongga peritoneal larva sebanyak 5×10^3 sel/larva dalam 0,5 μ L larutan hasil elektroporasi. Setiap perlakuan voltase disuntikkan pada 50 ekor larva ikan nila berumur tiga hari setelah menetas.

Larva yang telah disuntik dipelihara dalam akuarium ukuran 30x20x20 cm³, diberi pakan hidup berupa naupli *Artemia* dan cacing sutra secara *ad libitum*. Pemberian pakan hidup dilakukan selama tujuh hari. Pemeliharaan dilanjutkan dengan pemberian pakan komersial (kadar protein 28–30%) tiga kali sehari secara *at satiation* pada akuarium 50x60x40 cm³.

Deteksi kolonisasi sel donor

Deteksi sel donor dilakukan pada ikan resipien pada umur tujuh hari dan 50 hari pascatransplantasi. Sel donor dideteksi dengan menggunakan mikroskop *fluorescent* (Olympus BH2) untuk mengetahui pendaran dari gen GFP. Keberhasilan kolonisasi sel donor dilihat dari persentase ikan yang membawa gen GFP dibandingkan dengan total ikan yang diamati pada ikan umur 50 hari pascatransplantasi. Sel gonad yang membawa gen GFP berpendar warna hijau ketika diamati di bawah mikroskop yang dilengkapi dengan filter GFP.

Analisis statistik

Data persentase sel yang hidup dan sel membawa gen GFP dianalisis dengan metode sidik ragam (ANOVA), sedangkan keberhasilan

transplantasi dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, grafik, serta gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kelangsungan hidup (KH)

Peningkatan voltase dalam elektroporasi mengakibatkan penurunan jumlah sel yang hidup. KH terendah ($48,28 \pm 1,00\%$) terdapat pada perlakuan 300 volt ($P < 0,05$). KH sel perlakuan 100 dan 200 volt, serta kontrol tidak berbeda secara statistik ($P < 0,05$; Gambar 1).

Persentase sel berpendar

Pengamatan ekspresi gen GFP pada sel testikular ikan nila setelah dielektroporasi menunjukkan bahwa persentase sel berpendar GFP tidak berbeda antar perlakuan voltase ($P < 0,05$; Gambar 2). Persentase sel berpendar berkisar 48,00–55,33%. Konfirmasi menggunakan metode PCR juga menunjukkan bahwa perlakuan elektroporasi berhasil memasukkan gen GFP ke dalam sel testikular, ditunjukkan oleh pita DNA berukuran 600 bp yang sama ukurannya dengan kontrol plasmid GFP (tanda kepala panah; Gambar 3a).

Kolonisasi sel testikular

Ekspresi gen GFP setelah tujuh hari pascatransplantasi terlihat pada perlakuan 100, 200, dan 300 volt, yakni berupa pendaran di tubuh benih ikan nila (Gambar 3b). Ekspresi gen GFP juga terdeteksi pada ikan nila setelah 50 hari pascatransplantasi pada semua perlakuan voltase (Gambar 4), sedangkan kontrol tidak menunjukkan adanya ekspresi gen GFP. Persentase keberhasilan kolonisasi sel setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

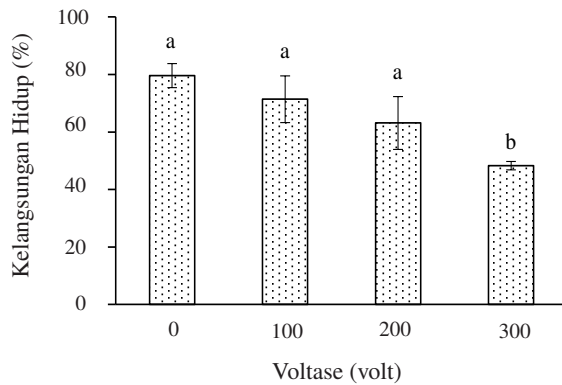
Pembahasan

Elektroporasi mengakibatkan membran sel mengembang, membentuk pori-pori dan bersifat

Tabel 1. Persentase kolonisasi sel testikular ikan nila yang ditransplantasi pada gonad ikan nila umur 50 hari pascatransplantasi

Voltase (volt)	Jumlah ikan yang diamati (ekor)	Jumlah ikan yang mempunyai pendaran GFP (ekor)	Persentase kolonisasi (%)
0	5	0	0
100	4	2	50,0
200	3	2	66,7
300	5	3	60,0

Keterangan: GFP=green fluorescent protein.

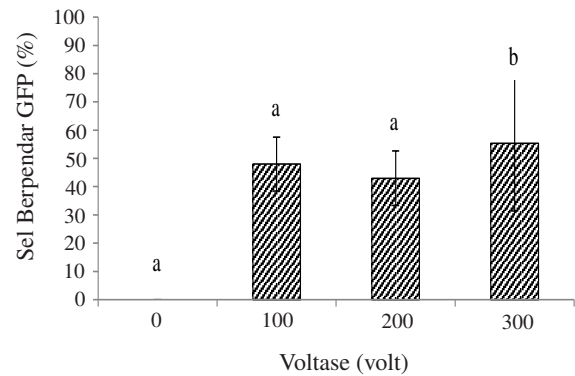


Gambar 1. Persentase sel testikular ikan nila yang hidup pascaeletroporasi dengan voltase yang berbeda. Huruf berbeda di atas *bar* menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

permeabel saat membran mencapai ambang batas toleransi tegangan akibat kejutan listrik (Tsong, 1991; Martinez & Hollenbeck, 2003). Pembentukan pori-pori pada membran sel mengakibatkan berbagai zat dapat terserap ke dalam sel dan mengubah struktur organel di dalam sel (Tsong, 1991; Liu *et al.*, 2006; Rols, 2008; Escoffre *et al.*, 2009). Penggunaan voltase yang terlalu tinggi dapat merusak membran bahkan mengakibatkan kematian pada sel. Kerusakan sel akibat voltase terbukti pada hasil penelitian yang menunjukkan kecenderungan penurunan jumlah sel yang hidup seiring dengan meningkatnya voltase (Gambar 1).

Perubahan voltase mempunyai dampak yang besar terhadap kelangsungan hidup (KH) dan ekspresi gen. KH sel yang diberi perlakuan 300 volt lebih rendah ($P < 0,05$) daripada perlakuan voltase 100 dan 200 volt. Namun demikian, pada kisaran voltase 100–300 volt, jumlah sel berpendar GFP secara statistik adalah sama ($P < 0,05$). Jumlah sel berpendar GFP yang sama pada perlakuan dapat disebabkan oleh *buffer* yang digunakan dalam elektroporasi. *Buffer* yang digunakan dalam elektroporasi dapat menjadi berbahaya bagi sel, menurunkan efektivitas transfeksi, dan mengakibatkan kematian pada sel. Faktor lain yang dapat menyebabkan penurunan efektivitas transfeksi adalah kepadatan sel, konsentrasi plasmid dan waktu penanganan pascatransfeksi (Li *et al.*, 2013).

Keberhasilan masuknya gen GFP ke dalam sel melalui elektroporasi juga dibuktikan dengan hasil amplifikasi menggunakan PCR. Perlakuan 100, 200, dan 300 volt memiliki pita DNA 600 bp, sama panjangnya dengan kontrol plasmid GFP (Gambar 3). Perlakuan 0 volt tidak memperlihatkan ekspresi dikarenakan gen GFP tidak mampu melewati membran sel

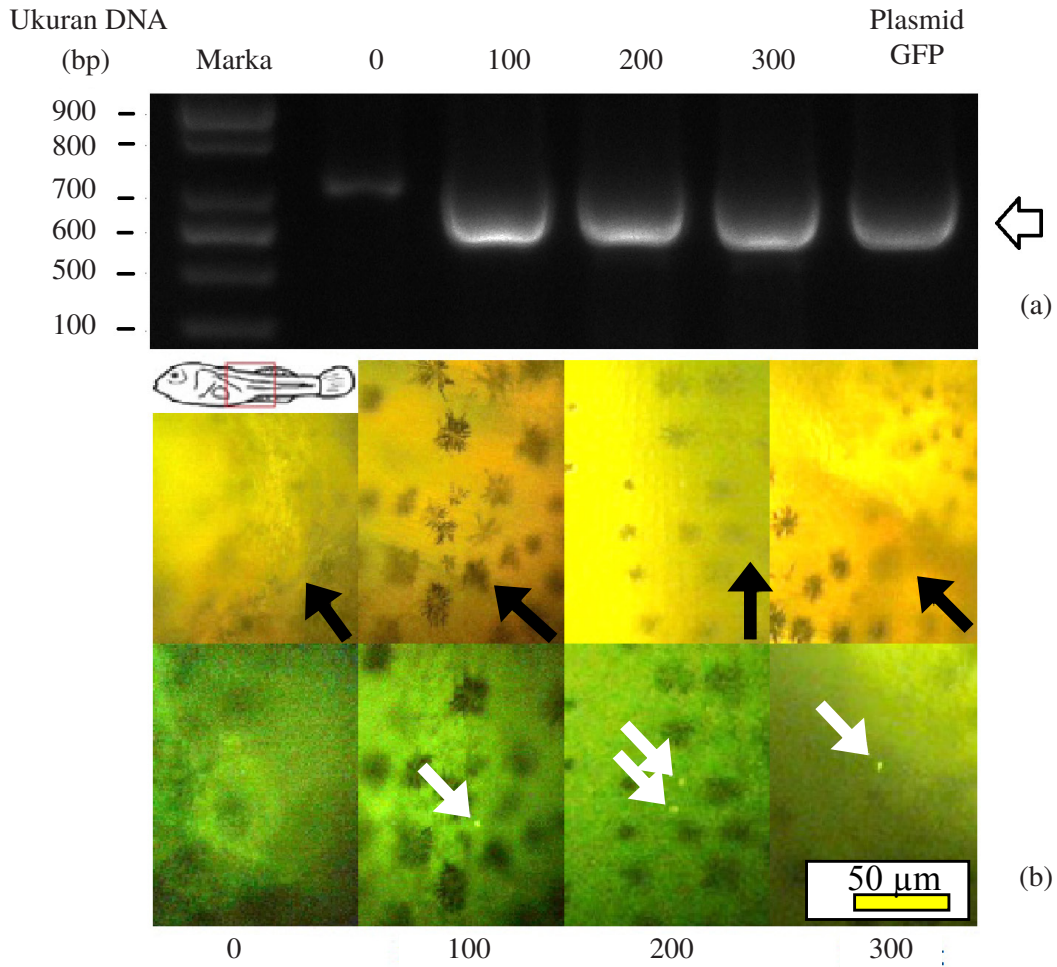


Gambar 2. Persentase sel testikular ikan nila berpendar *green fluorescent protein* (GFP) setelah dieletroporasi menggunakan voltase berbeda dalam larutan mengandung gen GFP. Huruf berbeda di atas *bar* menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

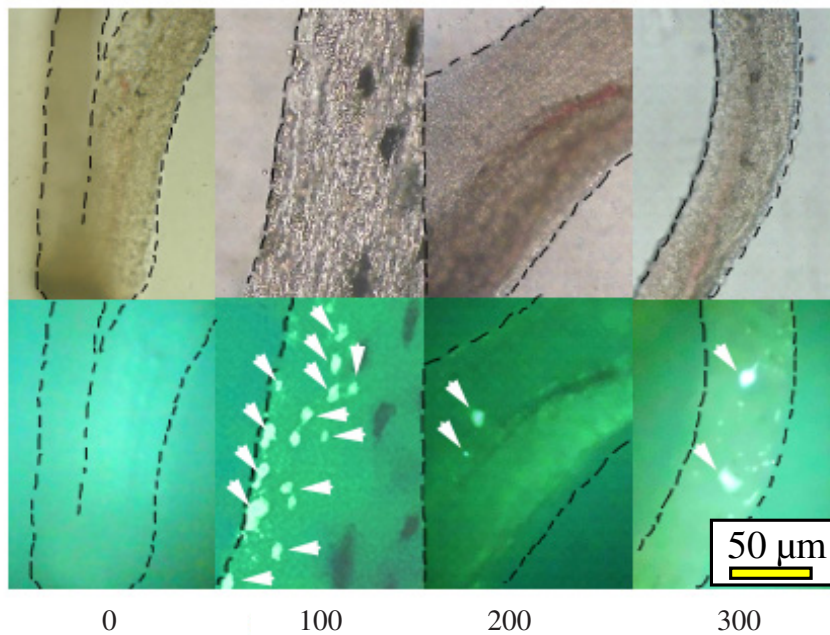
akibat kurang atau tidak adanya tegangan listrik. Selanjutnya kelangsungan hidup sel tidak berbeda dengan kontrol. Dengan demikian elektroporasi sel testikular ikan nila sebaiknya menggunakan 100–200 volt.

Transplantasi sel hasil elektroporasi dilakukan secara intraspecies pada rongga intraperitoneal larva ikan nila berumur tiga hari setelah menetas. Pada hari ketujuh pascatransplantasi, pengamatan menunjukkan adanya inkorporasi sel berpendar GFP di tubuh resipien (Gambar 4). Deteksi kolonisasi sel donor dalam resipien dilakukan pada umur 50 hari pascatransplantasi dengan persentase keberhasilan 66,67% pada perlakuan 200 volt, dan relatif lebih tinggi daripada perlakuan 100 volt (Gambar 5). Hal tersebut menunjukkan bahwa belum terjadi penolakan dari sistem imun (*rejection immune system*) pada ikan resipien terhadap sel donor ketika dilakukan transplantasi. Sel donor tidak terkolonisasi ketika resipien (ikan *rainbow trout*) yang digunakan telah berumur 45 hari setelah fertilisasi (Takeuchi *et al.*, 2003). Begitu pula dengan Okutsu *et al.* (2006) yang mengatakan bahwa *primordial germ cells* (PGC) ikan *rainbow trout* yang ditransplantasi ke larva ikan *salmon masu* yang telah berusia lebih dari 45 hari tidak dapat terkolonisasi karena sistem imunnya telah berkembang dengan sempurna.

Kolonisasi sel yang terlihat memberikan dampak positif terhadap perkembangan metode pemberian label pada sel donor, sehingga proses transplantasi dapat dipersingkat tanpa perlu menghasilkan ikan transgenik yang stabil (generasi kedua atau F2). Selain itu, perkembangan sel yang membawa label GFP dalam resipien memungkinkan dihasilkannya ikan transgenik dari ikan nontransgenik (Yoshizaki *et al.*, 2005)



Gambar 3. (a) Elektroforegram produk *polymerase chain reaction* (PCR) dari sel yang dielektroporasi dengan tegangan listrik 0, 100, 200, 300 volt dan plasmid *green fluorescent protein* (GFP). Tanda kepala panah menunjukkan pita dari gen GFP. (b) Visualisasi pendaran GFP pada larva ikan nila tujuh hari setelah transplantasi (atas: foto tanpa filter; bawah: foto dengan filter GFP). Tanda panah putih menunjukkan sel testikular yang berpendar GFP dan tanda panah hitam menunjukkan arah kepala ikan.



Gambar 4. Visualisasi pendaran *green fluorescent protein* (GFP) dalam gonad ikan nila 50 hari setelah transplantasi (atas: foto tanpa filter; bawah: foto dengan filter GFP). Tanda panah menunjukkan sel testikular yang berpendar GFP.

dengan menggunakan gen penyandi karakter penting dalam akuakultur atau yang berperan dalam meningkatkan mutu ikan budidaya.

KESIMPULAN

Metode pelabelan sel testikular ikan dengan elektroporasi berpotensi tinggi digunakan untuk mendukung teknologi transplantasi sel germinal. Voltase yang memberikan persentase individu terkolonisasi sel donor yang terbanyak untuk elektroporasi sel testikular ikan nila adalah 200 volt.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan dana melalui program Beasiswa Unggulan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad M, Alimuddin, Carman O, Arfah H, Zairin MJr. 2009. Penggunaan gen GH sebagai marka molekuler DNA gurami *Osphronemus goramy* dalam pengembangan teknologi surrogate broodstock. *Jurnal Perikanan* 11: 157–160.
- Andre F, Mir LM. 2004. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene therapy* 1: 33–42.
- Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, Teissie J, Dean D, Rols MP. 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Molecular Biotechnology* 41: 286–295.
- Farlora R, Kobayashi SI, França LR, Batlouni SR, Lacerda SMSN, Yoshizaki G. 2009. Expression of GFP in transgenic tilapia under the control of the medaka beta-actin promoter: establishment of a model system for germ cell transplantation. *Animal Reproduction* 6: 450–459.
- Firdaus M, Alimuddin, Sumantadinata K. 2013. Transplantasi sel testikular ikan neon tetra *Paracheirodon innesi* pada larva ikan mas *Cyprinus carpio*. *Jurnal Akuakultur Indonesia* 12: 1–12.
- Hong N, Chen S, Ge R, Song J, Yi M, Hong Y. 2012. Interordinal chimera formation between medaka and zebra fish for analyzing stem cell differentiation. *Stem Cells and Development* 21: 2.333–2.341.
- Knight DE, Scrutton MC. 1986. Gaining access to the cytosol: the technique and some application of electroporation. *Biochemistry Journal*. 234: 497–506.
- Li F, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Enatsu N, Chiba K, Yue H, Fujisawa M. 2013. Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat sertoli cells by electroporation. *Biology of Reproduction* 88: 1–6.
- Liu F, Heston S, Shollenberger, Sun B, Mickle M, Lovell M, huang L. 2006. Mechanism of in vivo DNA transport into cells by electroporation: electrophoresis across the plasma membrane may not be involved. *The Journal of Gene Medicine* 8: 353–361.
- Martinez CY, Hollenbeck PJ. 2003. Transfection of primary CNS and PNS neurons by electroporation. *Methods in Cell Biology* 71: 321–332.
- Mir LM, Moller PH, Andre F, Gehl J. 2005. Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Advances in Genetics* 54: 83–114.
- Mir LM. 2008. Application of electroporation gene therapy: past, current, and future. *Methods in Molecular Biology* 423: 3–17.
- Okutsu T, Shikina S, Kanno M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317: 1.517.
- Okutsu T, Yano A, Nagasawa A, Shikina S, Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2006. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *Journal of Reproduction and Development*. 52: 1.087–1.092.
- Rols MP. 2008. Mechanism by which electroporation mediates DNA migration and entry into cells and targeted tissues. *Methods in Molecular Biology* 423: 19–33.
- Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplantation primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction* 69: 1.142–1.149.
- Tsong TY. 1991. Electroporation of cell membranes [Minireview]. *Biophysical Journal*. 60: 297–306.
- Yazawa R, Hirano I, Aoki T. 2005. Characterization of promoter activities of four different Japanese flounder promoters in transgenic zebrafish.

- Marine Biotechnol. 7: 625–633.
- Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y. 2010. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Animal Reproduction* 7: 187–196.
- Yoshizaki G, Tago Y, Takeuchi Y, Sawatari E, Kobayashi E, Takeuchi T. 2005. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a non-transgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae. *Biology of Reproduction* 73: 88–93.