



**LAPORAN AKHIR
PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA**

**PRODUKSI STRAIN 'NILA MERAH OMEGA-3' KAYA EPA DAN DHA:
INTRODUKSI GEN Om Δ 5FAD DAN MELO MELALUI METODE
ELEKTROPORASI**

BIDANG KEGIATAN: PKM-P

Disusun oleh:

Habib Fadhlan Tamami	C14100048	2010
Kurdianto	C14100014	2010
Dede Dadang Suhaya	C14100015	2010
Imam Rusydi Hasibuan	C14100089	2010
Rangga Garnama	C14100029	2009

Dibiayai oleh:

Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi

Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan

sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Program Kreativitas Mahasiswa

Nomor : 050/SP2H/KPM/Dit.Litabmas/V/2013, tanggal 13 Mei 2013

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

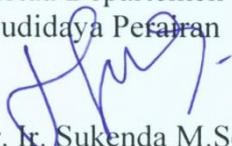
2013

HALAMAN PENGESAHAN

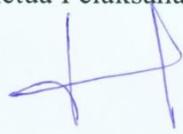
1. Judul Kegiatan : Produksi Strain ‘Nila Omega-3’ Kaya EPA Dan
DHA: Konsentrasi Efektif DNA Pada Transgenesis
Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Dengan Gen
Om Δ 5FAD melalui metode Elektroforasi.
2. Bidang Kegiatan : PKM-P
3. Ketua Pelaksana Kegiatan
 - a. Nama Lengkap : Habib Fadhlán Tamami
 - b. NIM : C14100048
 - c. Jurusan : Budidaya Perairan (BDP)
 - d. Institut : Institut Pertanian Bogor (IPB)
 - e. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Komplek Bina Karya I, No 95,
Desa
Cimekar Rt 01/04, Kecamatan
Cileunyi, Kabupaten Bandung.
HP. 085770239799
 - f. Alamat email : habibfadhlantamami@yahoo.com
4. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis : 4 orang
5. Dosen Pendamping
 - a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Alimuddin, S.Pi, M.Sc
 - b. NIDN : 0003017007
 - c. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Jl. Cinangneng Asri 115, Rt 01/01
Bojong Jengkol, Ciampea 16620
Bogor. HP. 081383850926
6. Biaya Kegiatan Total :
 - a. Dikti : Rp. 11.200.000
 - b. Sumber lain : -
7. Jangka Waktu Pelaksanaan : 3 bulan

Bogor, 20 Agustus 2013

Menyetujui
Ketua Departemen
Budidaya Perairan


Dr. Ir. Sukenda M.Sc
NIP.19671013 199302 1 001

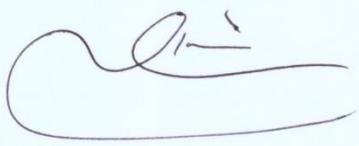
Ketua Pelaksana Kegiatan,


Habib Fadhlán Tamami
NIM. C14100048

Mengetahui,
Wakil Rektor Bidang Akademik dan
Kemahasiswaan


Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, M S
NIP. 19581228 198503 1 003

Dosen Pembimbing


Dr. Alimuddin, S.Pi, M.Sc
NIDN.0003017007

**THE PRODUCTION OF RED TILAPIA STRAINS
RICH IN OMEGA-3 EPA AND DHA:
Om Δ 5FAD GENE INTRODUCTION And MELO THROUGH
ELECTROPORATION METHOD**

**Habib Fadhlan Tamami¹⁾, Kurdianto²⁾, Dede Dadang Suhaya³⁾, Imam Rusydi
Hasibuan⁴⁾, Rangga Garnama⁵⁾**

¹Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian
Bogor (Penulis 1)

Email : habibfadhlantamami@yahoo.com

ABSTRAK

*Omega-3 fatty acids EPA and DHA is a polyunsaturated fatty acid that has an important function in the development of the brain and eye function. Improvement of the quality of Tilapia fish as a source of EPA and DHA are important for the particular strains are capable of producing both kinds of fatty acids in significant quantities. So the Tilapia which have similarities to one of the marine fish that can replace the role of snapper Snapper with an increasingly balanced nutritional approach as a substitute for fish. This new Strain of Tilapia can produce a breakthrough in the form of foodstuffs rich in EPA and DHA is relatively inexpensive and can be reached by virtually the entire community of Indonesia. Ease of access to foodstuffs rich in EPA and DHA provides benefits in the form of increased public health conditions, decreased the risk of health problems due to deficiency of EPA and DHA. Through this research, the treatment of metabolic enzymes gene transfer penyandi Δ 5-desaturase (Om Δ 5FAD) fish of the masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in tilapia (*Oreochromis niloticus*) are expected to produce a superior strains able to synthesize EPA and DHA in significant quantities so as to provide alternative sources of EPA and DHA as a substitution of snapper is relatively inexpensive and easily obtained by society at large.*

Key words: *EPA , DHA, Tansgenesis, Tilapia, Om Δ 5FAD*

JUDUL PROGRAM

Produksi Strain ‘Nila Merah Omega-3’ Kaya EPA dan DHA: Introduksi Gen Om Δ 5FAD dan MELO melalui Metode Elektroporasi

I. PENDAHULUAN

Sumber utama EPA dan DHA adalah ikan laut hasil kegiatan perikanan tangkap walaupun kecenderungannya cenderung statis bahkan mengalami penurunan “*over fishing*” (Meyers & Worm, 2003). Masyarakat kurang mendapatkan nutrisi dalam bentuk asam lemak Omega-3 EPA dan DHA yang lebih banyak terdapat pada ikan laut dibandingkan ikan tawar. Asam lemak Omega-3 EPA dan DHA merupakan asam lemak tidak jenuh yang memiliki fungsi penting dalam perkembangan otak, fungsi mata (Lauritzen *et al.*, 2001). Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) adalah salah satu jenis ikan air tawar yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia. Departemen Perikanan dan Akuakultur FAO (*Food and Agriculture Organization*) menempatkan ikan nila di urutan ketiga setelah udang dan salmon sebagai contoh sukses perikanan budidaya dunia.

Usaha perbaikan mutu ikan nila sebagai sumber EPA dan DHA penting dilakukan agar terdapat strain khusus yang mampu memproduksi kedua jenis asam lemak dalam jumlah yang signifikan. Sehingga ikan nila yang memiliki kemiripan dengan salah satu ikan laut yaitu ikan kakap dapat menggantikan peran ikan kakap dengan pendekatan nutrisi yang semakinimbang sebagai ikan substitusi. Strain nila baru ini dapat menghasilkan terobosan berupa bahan pangan kaya EPA dan DHA yang relatif murah dan dapat dijangkau oleh hampir seluruh masyarakat Indonesia. Kemudahan akses terhadap bahan pangan kaya EPA dan DHA memberikan manfaat berupa peningkatan kondisi kesehatan masyarakat, berkurangnya resiko gangguan kesehatan akibat defisiensi EPA dan DHA.

Transgenesis merupakan salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk menciptakan strain ikan nila yang secara nutrisi dapat mensubstitusi ikan kakap. Keunggulan teknologi ini adalah dapat mentransfer karakter yang diinginkan dalam satu generasi dan dapat diturunkan pada generasi selanjutnya (Yaskowiak *et al.*, 2006). Keberhasilan teknologi transgenesis gen penyandi enzim metabolik asam lemak telah dibuktikan oleh Alimuddin *et al.* (2007).

Melalui penelitian ini, perlakuan transfer gen penyandi enzim metabolik $\Delta 5$ -desaturase (Om $\Delta 5$ FAD) dari ikan masu salmon (*Oncorhynchus masou*) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) diharapkan dapat menghasilkan strain unggul yang mampu mensintesis EPA dan DHA dalam jumlah yang signifikan sehingga dapat menyediakan alternatif sumber EPA dan DHA sebagai substitusi ikan kakap yang relatif murah dan mudah diperoleh oleh masyarakat luas.

II. LUARAN

Luaran yang diharapkan dari program kreativitas mahasiswa ini adalah dapat memproduksi nila merah (*Oreochromis niloticus*) transgenic generasi founder (F0) pembawa gen Om $\Delta 5$ FAD dan MELO yang selanjutnya akan berguna sebagai calon induk untuk memproduksi ikan nila merah transgenic generasi pertama (F1) dan kedua (F2) dan sebagai publikasi ilmiah mengenai kegiatan penelitian yang dilaksanakan.

III. METODE PELAKSANAAN

Kegiatan PKM Penelitian ini dilaksanakan melalui beberapa tahapan, yaitu:

a. Persiapan alat dan bahan

Kegiatan persiapan alat dan bahan diawali dengan perizinan peminjaman, pembelian alat dan bahan yang diperlukan, serta sterilisasi area kerja. Induk ikan nila diperoleh dari Balai Budidaya air Tawar Sukabumi. Jawa Barat..

b. Pemeliharaan induk, pemijahan dan pengambilan telur

Induk jantan dan induk betina ikan nila dipelihara di dalam bak yang berdimensi (60x50x50) cm, berisi air $\frac{3}{4}$ dari volume total. Pakan untuk induk adalah pelet F999 yang diberikan 2 kali sehari secara *ad satiation* atau sekenyangnya. Pengambilan telur dilakukan setelah ikan memperlihatkan ciri-ciri akan memijah kemudian di striping jika sudah terlihat tanda-tanda tersebut.

c. Isolasi Plasmid

Kultur bakteri *Eschericia coli* yang mengandung kontruksi plasmid Om $\Delta 5$ FAD diambil sebanyak 3 ml. Lalu dimasukkan kedalam *mikrotube*. Selanjutnya plasmid diisolasi menggunakan kit isolasi plasmid (GE Healthcare). Purifien plasmid DNA disimpan dalam suhu -20°C begitu pula untuk gen MELO.

d. Pelaksanaan Elektroporasi

Pelaksanaan elektroporasi dilakukan setelah pengecekan motilitas sperma yang akan digunakan. Elektroporasi sperma dilakukan dengan menggunakan mesin *Gene Pulser II* (Biorad, USA). Sebelum dicampur dengan plasmid, pengenceran dilakukan dengan pencampuran menggunakan larutan fisiologis (1:7). Elektroporasi dilakukan dengan tipe kejutan *square wave* dengan panjang kejutan (*pulse length*) 30 milidetik dan interval kejutan (*pulse interval*) 0.1 detik. Konsentrasi DNA plasmid yang digunakan adalah 10ug/ml dalam tris-EDTA.

e. Pemijahan buatan sperma dan telur ikan nila

Pemijahan dilakukan dengan mencampurkan telur dan sperma ikan nila yang telah dielektroporasi ke dalam cawan petri dan ditambahkan larutan fisiologis (NaCl 0,9%), kemudian diaduk menggunakan bulu ayam untuk mencampur telur dan sperma. Air ditambahkan ke dalam cawan petri berisi sperma dan telur, dan waktu pencampuran tersebut dihitung sebagai waktu pembuahan. Setelah dibiarkan selama 3 menit, sisa-sisa sperma dibuang atau dipisahkan dari telur dan selanjutnya telur diinkubasi dalam akuarium untuk proses penetasan.

f. Deteksi DNA

Ekstraksi DNA. Pada sampel sperma, sebelum dilakukan ekstraksi DNA, sampel sperma dicuci untuk membuang sisa plasmid pada media elektroporasi. Adapun untuk larva, tidak perlu dilakukan pencucian terlebih dahulu. Sperma hasil elektroporasi dicuci dengan cara menambahkan larutan fisiologis dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, pelet sperma diresuspensi dengan menggunakan 20 µl larutan fisiologis. Proses pencucian pelet sperma diulang sebanyak tiga kali.

Sampel sperma atau larva dimasukkan ke dalam tabung mikro, ditambahkan 200 µl *cell lysis solution* (Puregene, Minneapolis, USA), 2 µl *Proteinase K* (20 mg/ml) dan selanjutnya dihomogenasi menggunakan vorteks. Inkubasi dilakukan pada suhu 55°C selama semalam (*overnight*). *RNase* sebanyak 2 µl (4 mg/ml) ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk dengan hati-hati dengan cara membolik-balik tabung mikro. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit dan disimpan dalam suhu 4°C selama 5 menit. Sebanyak 200 µl *protein*

precipitation solution (Puregene, Minneapolis, USA) ditambahkan ke dalam larutan, diaduk perlahan, dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro berisi isopropanol, lalu tabung mikro dibolak-balik sebanyak 50x dengan hati-hati dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 - 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 300 µl Etanol 70% dingin. Sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan pelet DNA dikering-udarkan. *Steril distilled water* (SDW) sebanyak 50 µl digunakan untuk melarutkan DNA. Larutan DNA dapat disimpan dalam freezer (suhu -20°C) hingga akan digunakan dalam proses selanjutnya.

Polymerase chain reaction. Primer yang digunakan dalam proses PCR adalah primer spesifik Om5FAD dan gen elongase (MELO). Sekuen primer untuk Om5FAD adalah sebagai berikut: forward (5'-GGACTGGCTCACCATGCAGTTGAGT-3') dan reverse (5'-TTCTCTGTTACAGGTTGTTAATCTGC-3') (Alimuddin *et.al* 2006). dan untuk MELO adalah forward (5'-TTGCACTAACAGTCATGTACCTGCTGA-3') dan reverse (5'-CTTTCCTGTGTGTAATGGTTTCCGTG-3') (Alimuddin *et.al* 2007).

Pada proses PCR, jumlah volume total yang digunakan adalah 10 µl yang mengandung 1 µl 10x Ex *Taq buffer*, 1 µl dNTPs mix, 0,05 µl Ex *Taq polymerase* (Takara Bio, Shiga, Japan), 1 µl DNA templat, 1 µl primer setiap primer, dan volume sisanya adalah SDW. Program PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 45 detik, *annealing* 63°C selama 30 detik (untuk β-aktin), dan ekstensi akhir 72 °C selama 3 menit. Visualisasi hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7% dengan tegangan 200 Volt dan kuat arus 70 mA.

g. Analisa Data

Parameter yang diamati meliputi derajat kelangsungan hidup embrio (DKH-e), derajat penetasan, persentase individu yang mengekspresikan gen OmΔ5FAD, dan kelangsungan hidup (SR).

h. Evaluasi

Evaluasi dilakukan untuk memperbaiki dan menganalisis hasil yang telah diperoleh yang selanjutnya digunakan untuk mengambil sebuah keputusan bersama terkait pelaksanaan program serta membuat kesimpulannya. Evaluasi tersebut dilakukan setiap satu minggu sekali.

i. Konsultasi dan Pembimbingan

Kegiatan konsultasi dan pembimbingan oleh dosen pembimbing dilakukan setiap hari kerja (Senin hingga Jumat) baik secara langsung maupun tidak langsung. Permasalahan dan kesulitan dalam melakukan kegiatan penelitian dikemukakan dan selanjutnya didiskusikan bersama.

IV. KEMAJUAN PEKERJAAN

Kegiatan PKM Penelitian ini sudah selesai dilaksanakan sampai pada tahap akhir (50%) . namun karena hasil analisa gen Om Δ 5FAD negatif perlu dilakukan elektroporasi ulang pada gamet yang baru. Akhir Agustus diharapkan penelitian ulang telah dilakukan dan didapatkannya hasil yang baik.

V. KETERCAPAIAN

Target luaran dan luaran yang dicapai dapat dilihat melalui tabel 1 mengenai kemajuan pelaksanaan program.

Tabel 1. Kemajuan Pelaksanaan Program

TARGET LUARAN	WAKTU PELAKSANAAN	METODE	LUARAN (per 5 Mei 2012)
Menghasilkan ikan nila (<i>Oreochromis niloticu</i>) transgenik generasi <i>founder</i> (F0) pembawa gen Om Δ 5FAD dan MELO yang digunakan sebagai calon induk untuk produksi ikan nila transgenik generasi pertama (F1).	22 April 2013 dan 22 Juni 2013	Analisis keberhasilan transgenesis dengan PCR dan elektroforesis	(belum tercapai) Gen Om Δ 5FAD Tidak positif terintroduksi
Menganalisis	22 April 2013		(Belum tercapai)

keberhasilan metode introduksi gen Om Δ 5FAD dengan metode elektroporasi	dan 23 Juni 2013	
Memperoleh strain ikan 'nila merah omega-3' (<i>stable line</i>) yang mampu mensintesis EPA dan DHA dalam jumlah yang signifikan pada tahapan penelitian selanjutnya	-	Pemeliharaan individu transgen hingga matang gonad, dilanjutkan dengan analisis dengan PCR dan elektroforesis untuk mengetahui ada atau tidaknya gen Om Δ 5FAD pada gonad (Belum tercapai)

Penelitian mengenai Produksi Strain 'Nila Merah Omega-3' Kaya EPA dan DHA: Introduksi Gen Om Δ 5FAD dan MELO melalui Metode Elektroporasi pada walnya telah mencapai tahapan akhir, namun pada tahap analisa DNA hasil menunjukkan gen Om Δ 5FAD tidak tersisipi (negatif), namun analisa gen MELO dan β -actin belum dilaksanakan, dan akan dilaksanakan pada hari rabu tanggal 29 Mei 2013.

Berdasarkan hasil yang didapatkan keberhasilan suatu individu untuk membawa gen yang ditransfer dipengaruhi oleh keberhasilan gen untuk terintegrasi dalam genom. Iyengar *et al.* (1996) melaporkan bahwa gen yang ditransfer akan direplikasi tanpa mengalami integrasi ke dalam genom resipien pada awal perkembangan embrio. Selanjutnya, gen asing yang terintegrasi akan stabil di sel resipien, sementara dalam bentuk ekstrakromosomal akan terdegradasi oleh endogenous nuclease (Hackett, 1993). Sementara menurut Alimuddin *et al.* (2003), jika gen terintegrasi ke dalam genom sebelum pembelahan sel pertama, gen akan didistribusikan ke setiap sel dan 50% dari germ sel akan memiliki gen asing tersebut setelah meiosis. Namun demikian, integrasi biasanya terjadi setelah sel membelah beberapa kali. Oleh karena itu, akan terdapat dua macam sel, yaitu memiliki gen yang ditransfer dan yang tidak membawa, yang dikenal dengan istilah mosaik. Keadaan mosaik ini menyebabkan persentase keturunan yang membawa gen asing tersebut akan sangat

bervariasi. Namun jika melihat dari hasil yang diperoleh, gen tidak terintroduksi dikarenakan masalah kualitas plasmid yang digunakan tidak sesuai dengan prosedur yang ada dan metodenya pun dilakukan dengan langsung memixkan kedua gen Om Δ 5FAD dan MELO sehingga sulit dianalisa DNA nya, namun pada dasarnya setelah di periksa β -actin nya maka akan diketahui terintroduksi atau tidaknya kedua gen tersebut.

VI. PERMASALAHAN DAN PENYELESAIAN

Permasalahan	Solusi
Kualitas telur nila yang kurang baik	Menunggu waktu striping telur yang tepat
Koleksi gamet yang sulit diprediksi	Pengecekan rutin dan pembelajaran history pemijahan indukan
Metode elektroporasi yang efektif dengan mencampurkan 2 gen	Membuat beberapa perlakuan dengan memisahkan kedua gen dalam perlakuan dan memix kedua gen tersebut dalam metode elektroporasinya.

VII. PENGGUNAAN BIAYA

1. Administrasi

Pembuatan proposal (rental, print, jilid dan perbanyak)	Rp 125.000
Pembuatan surat perizinan	Rp 20.000
Pembuatan laporan kemajuan	Rp 100.000
Jumlah	Rp. 245. 000

2. Alat dan Perlengkapan

Baskom telur 3 buah @ 15.000	Rp 45.000
Akuarium (20x20x20 cm) 6 buah @ Rp. 25.000	Rp 150.000
Rak Akuarium 2 set @ Rp. 150.000	Rp 200.000
Pipet tetes 4 buah Rp. 10.000	Rp 40.000
Termometer 6 buah @ Rp. 15.000	Rp 90.000
Heater 6 buah @Rp.85.000	Rp 510.000
Batu aerasi 10@5000	Rp 50.000
Selang aerasi	Rp 55.000
Blower 1 unit @Rp.400.000	Rp 400.000
Instalasi Air dan aliran air 1 set @Rp. 200.000	Rp 200.000
Tandon 1 set @Rp.200.000	Rp 200.000
Siring 7 buah @Rp. 2000	Rp 14.000
Tissue 1 pak @ 10.000	Rp 10.000
Kain 1 @ 5000	Rp 5000
Jumlah	Rp 1.969.000

3. Bahan Baku

Indukan Ikan nila 7 pasang @Rp.100.000	Rp 700.000
--	------------

Pelet F999 1sak	Rp 150.000
Ovaprim 10 ml	Rp 170.000
Artemia	Rp 100.000
Rotifer	Rp 100.000
Larutan fisiologis	Rp 10.000
<i>Methylen Blue</i>	Rp 35.000
Isolasi plasmid 2 sampel @sampel Rp 250.000	Rp 500.000
Jumlah	Rp. 1.765.000

3. Analisa Gen

Sewa Elektroporator 16 sampel + analisa DNA @ Rp. 350.000	Rp. 5.600.000
Jumlah Total	Rp. 9.579.000

Dana bantuan dari DIKTI adalah sebesar Rp. 11.200.000, total kegiatan PKM adalah sebesar Rp. 9.579.000 maka sisa dana PKM adalah sebesar Rp. 1.621.000. Sisa uang bantuan DIKTI tersebut akan digunakan untuk pengulangan kegiatan pkm dengan perlakuan terbaru.

VIII. DOKUMENTASI KEGIATAN

Pemeliharaan induk, pemijahan dan pengambilan telur (Sumber : Pribadi)



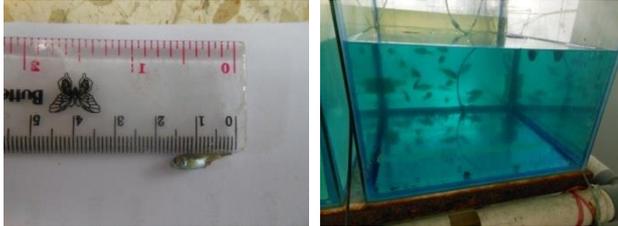
Isolasi Plasmid



Pelaksanaan Elektroporasi



Pemeliharaan larva



DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, Yoshizaki G., Carman O., Sumantadinata K. 2003. Aplikasi Transfer Gen dalam Akuakultur. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 2(1): 41–50.
- Hacket, P.B. 1993. *The molecular biology of transgenic fish*, p: 207-240. In: P.W. Hochachka & T.P. Mommsen, *Molecular Biology Frontiers*” (Eds.). Elsevier, New York.
- Iyengar, A., F. Muller & MacLean. 1996. Regulation and expression of transgenes in fish: a review. *Transgenic Res.*, 5: 147-166.
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 40, 1–94.
- Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadi A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zhank TK, Moreau H, Roscoe TJ, Zähringer U, Heinz E. 2004. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res.* 45, 1899–1909.

Nota Keuangan

