

PENGUNAAN METODE MIKROINJEKSI DAN ELEKTROPORASI DALAM TRANSFER GEN HORMON PERTUMBUHAN (GH) PADA IKAN KERAPU TIKUS (*Cromileptes altivelis*)

Slamet Subyakto¹, Gemi Triastutik¹, Rustidja², Komar Sumantadinata³, Alimuddin³, M. Sasmito Jati⁴, Irvan Faizal⁵, Ratu Siti Aliah⁵

¹ Balai Budidaya Air Payau Situbondo, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, DKP. E-mail: slamet_subyakto@yahoo.com

² Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

³ Departemen Budidaya Perikanan Fakultas Perikanan dan Kelautan, IPB

⁴ Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

⁵ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Kementerian Negara Riset dan Teknologi, Jakarta

Diterima 5 April 2010; disetujui 10 Mei 2010

ABSTRACT

Humpback grouper is one of the mariculture fish species that possess high economical price in Asia, including Indonesia. The main problem facing in humpback grouper culture is its low growth rate. Transgenesis technique may be one of the methods to solve the problem. This study was conducted to determine the effectiveness of microinjection and electroporation techniques to transfer of growth hormone gene in humpback grouper. Microinjection was carried out to 1-4 cell stage embryos using 25 µg/ml of foreign DNA solution, and duration of injection into each embryo was 1, 2 and 3 seconds. Electroporation by 50 V, 30 ms of pulse length, 5 of pulse number and 0.1 of pulse interval was performed to sperm using three DNA concentration of 5, 10 and 20 µg/ml. The incorporation of foreign DNA in sperm and embryos were analyzed using PCR method. Based on PCR analysis, an optimum DNA concentration for electroporation was 10 µg/ml. Limited number of embryos could be microinjected during 20-30 min of time to reach 4 cells stage embryos. Microinjection for 1 second was allowed higher number of embryos survived, although no or very low number of larvae was hatched. Our study revealed that microinjection as well as electroporation could be used as transgenesis methods for humpback grouper. By means of simplicity and efficacy, however, electroporation was an appropriate gene transfer method for humpback grouper.

Keywords : Microinjection, electroporation, transgenesis, growth hormone, humpback grouper

PENDAHULUAN

Dalam dua dekade terakhir ini, bermacam-macam organisme akuatik transgenik telah berhasil diproduksi oleh berbagai peneliti di seluruh dunia. Organisme transgenik ini diproduksi dengan cara mengintroduksi gen atau transgen penyandi protein menggunakan metode transgenesis yang berbeda-beda, yaitu mikroinjeksi, elektroporasi, transfeksi dan *particle gun bombardment* (Hackett, 1993; Chen *et al.*, 1995; Sarmasik *et al.*, 2001). Transgen tersebut dapat terintegrasi dan terekspresi pada keturunan ikan transgenik. Selanjutnya, organisme transgenik yang dihasilkan memiliki fenotipe seperti yang diharapkan. Sampai saat ini, sebagian besar organisme akuatik transgenik yang diproduksi adalah ikan air tawar karena kelompok ikan ini relatif mudah dipelihara di laboratorium. Beberapa ikan air tawar transgenik

yang telah berhasil diproduksi adalah seperti ikan *channel catfish* (Dunham *et al.*, 1987), ikan mas (Liu *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1993), ikan nila (Rahman and MaClean, 1992; Martinez *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 2007), ikan *mudloach* (Nam *et al.*, 2001), dan ikan zebra (Alimuddin *et al.*, 2005). Sebaliknya, penelitian ikan laut transgenik hasilnya masih sangat terbatas dan mendapat perhatian sedikit sekali, meskipun faktanya bahwa ikan laut mempunyai potensi nilai ekonomi tinggi dalam akuakultur.

Ikan kerapu tikus merupakan jenis komoditas laut yang memiliki nilai ekonomi tinggi di Asia. Namun demikian, salah satu permasalahan yang dihadapi dalam budidaya ikan kerapu tikus adalah pertumbuhannya yang relatif lambat (Cesar and Hempel, 2000). Pembesaran ikan kerapu tikus memerlukan waktu yang cukup lama, yaitu antara 8–24 bulan untuk mencapai ukuran 0,5–1,0 kg (Tucker,

1999; Teitelbaum, 2007). Aplikasi transgenesis diduga dapat menjadi suatu penyelesaian masalah pertumbuhan yang relatif lambat tersebut pada ikan kerapu tikus dan ikan laut lainnya.

Beberapa metode dapat digunakan untuk membuat ikan transgenik diantaranya adalah transfeksi, mikroinjeksi dan elektroporasi. Metode transfeksi berhasil digunakan untuk transfer gen pada ikan kakap silver (*Sparus sarba*) (Lu *et al.*, 2002) dan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) (Sun *et al.*, 2005). Metode mikroinjeksi berhasil pada transgenesis ikan salmon (Devlin *et al.*, 1995) dan ikan zebra (Alimuddin *et al.*, 2005). Metode elektroporasi dilaporkan berhasil digunakan dalam transfer gen ikan salmon (Sin *et al.*, 1993; Symon *et al.*, 1994) dan ikan zebra (Patil and Khoo., 1996; Rambubu *et al.*, 2005). Setiap metode transfer gen mempunyai efektivitas dan efisiensi yang berbeda bergantung kepada spesies ikan yang digunakan (Sarmasik, 2003).

Tujuan percobaan ini adalah untuk mengetahui efektivitas mikroinjeksi dan elektroporasi pada transfer gen hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) pada ikan kerapu tikus.

METODA

Waktu dan Tempat

Percobaan ini dilakukan pada bulan Agustus 2008 sampai dengan Maret 2010, bertempat di Laboratorium Bioteknologi dan Kesehatan Ikan BBAP Situbondo dan Laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.

Mikroinjeksi

Metode mikroinjeksi yang digunakan sama seperti yang telah berhasil diaplikasikan oleh Alimuddin *et al.* (2005). Mikroinjeksi dilakukan pada blastodisk embrio ikan kerapu tikus pada fase 1–4 sel di bawah mikroskop dengan bantuan mikroinjektor. Embrio diletakkan di atas cekungan gel agarosa 3% sebagai penahan saat ada tekanan dari jarum mikroinjeksi. Konsentrasi larutan DNA yang digunakan adalah 25 µg/ml, volume DNA yang

masuk ke dalam blastodisk diperkirakan sebanyak seperlima dari volume blastodisk (Ath-Thar, 2007). Jumlah embrio yang dimikroinjeksi untuk setiap periode penyuntikan pada satu kali pemijahan adalah antara 60–100 butir. Perlakuan yang ditetapkan adalah lama waktu penyuntikan: 1, 2 dan 3 detik, tujuannya adalah untuk mengetahui lama waktu penyuntikan yang paling baik, sehingga dapat menghasilkan banyak embrio yang berkembang dan membawa DNA. Embrio hasil injeksi yang hidup dan berkembang setelah 14 jam dari penyuntikan diambil sebanyak 20 butir untuk digunakan dalam analisis PCR guna memastikan bahwa DNA yang diinjeksikan masuk ke dalam embrio. Jumlah embrio yang hidup juga dihitung pada waktu tersebut untuk mengetahui tingkat keberhasilan metode mikroinjeksi.

Elektroporasi

Metode elektroporasi adalah metode transgenik dengan menggunakan rangkaian kejutan listrik untuk membuka pori-pori membran sel, dan menyebabkan transgen dapat masuk ke dalam sel. Elektroporasi dilakukan menggunakan mesin BioRad system, yang terdiri dari Gene Pulser Xcell Unit dengan CE Module, PC Module, dan ShockPod, pada 50 Volt, lama kejut 30 ms, jumlah kejutan 5, interval kejutan 0,1 µs, dan ukuran kuvet 0,2 dan 0,4 cm. Konsentrasi DNA yang diujicobakan adalah 5, 10 dan 20 µg/ml. Pada setiap perlakuan, dicampurkan dengan 25 µl sperma dan larutan fisiologis sebanyak 260 µl. Sperma hasil elektroporasi diambil 100 µl untuk analisis DNA, dan sekitar 5 µl untuk pengamatan motilitas sperma yang dilakukan dengan menggunakan mikroskop.

Ekstraksi DNA

Larutan fisiologis yang kemungkinan masih mengandung pktBP-ktGH dibuang setelah sperma diendapkan dengan menggunakan sentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Pencucian sperma dilanjutkan dengan menggunakan larutan fisiologis sebanyak 200 µL dan diulang 2 kali. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit IQ2000. DNA hasil ekstraksi dilarutkan dengan menggunakan DEPC sebanyak 50 µL, dan disimpan pada suhu –20°C, kondisi penyimpanan ini dipertahankan hingga akan digunakan dalam analisis PCR.

Amplifikasi PCR

Satu mikrogram DNA yang telah diekstraksi digunakan sebagai sampel untuk analisis PCR, kemudian dicampur dengan 1 µl primer forward maupun reverse (10 pmol), 1 µl dNTPs, 1 µl Ex *Taq* buffer, 0,05 µl Ex *Taq* polymerase (TAKARABIO) kemudian ditambahkan SDW sampai volume akhir menjadi 10 µl. Primer *forward* dan *reverse* yang digunakan adalah 5'-TTCATCCAGCTGA-TGATTGCCAGATGTAAC-3' dan 5'-AGTTGGCTTCAGGAGAGAGTTCGACA-TTAG 3'. Program PCR dengan 35 siklus amplifikasi dilakukan dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 62 °C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Dua mikroliter hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% dan visualisasi DNA menggunakan etidium bro-mida (EtBr), kemudian difoto pada kondisi diberi sinar ultra violet.

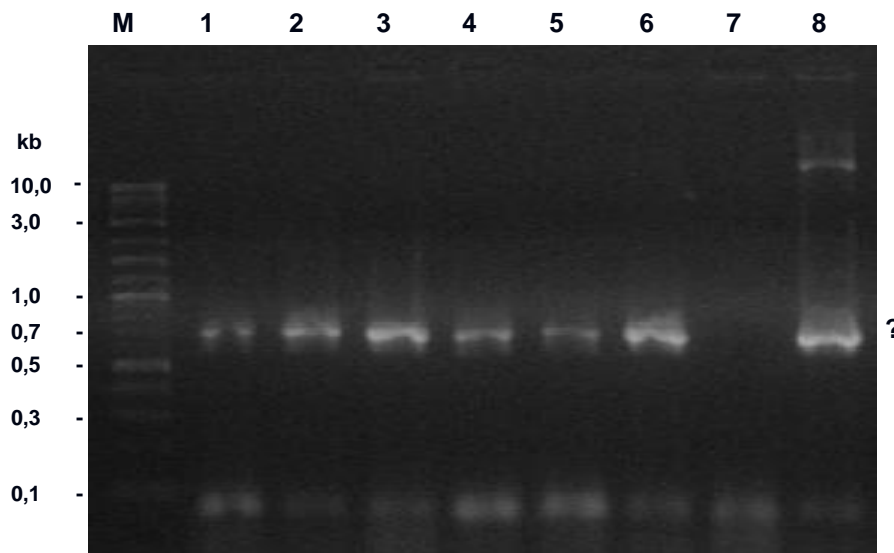
HASIL DAN PEMBAHASAN

Mikroinjeksi

Persentase embrio hidup yang dimikroinjeksi sampai 14 jam setelah penyuntikan menurun dengan meningkatnya lama waktu penyuntikan (Tabel 1). Semakin lama waktu penyuntikan menyebabkan bertambahnya volume DNA yang masuk ke dalam blastodisk. Hal ini diduga menjadi penyebab kematian embrio. Hal yang sama telah dilaporkan oleh At-Thar (2007) pada mikroinjeksi embrio ikan lele. Tingginya angka kelangsungan hidup embrio yang tidak disuntik (92,9%), menunjukkan bahwa telur yang digunakan untuk keperluan mikroinjeksi adalah berkualitas baik. Hasil PCR menggunakan DNA hasil ekstraksi dari 20 embrio umur 14 jam menunjukkan, bahwa semua kelompok perlakuan embrio yang dimikroinjeksi membawa DNA (Gambar 1). Hal ini mengisyaratkan bahwa DNA berhasil diinjeksikan ke dalam blastodisk.

Tabel 1. Jumlah dan prosentase embrio yang berkembang setelah diinjeksi DNA 25 µg/ml untuk lama waktu 1, 2 and 3 detik penyuntikan.

Perlakuan	Ulangan	Jumlah embrio yang berkembang	Jumlah embrio yang tidak berkembang	Prosentase embrio yang berkembang
1 detik	1	42	2	95,5
	2	41	14	74,5
	Rata-rata			85,0±14,8
2 detik	1	1	18	5,3
	2	3	42	6,7
	Rata-rata			6,1±1,0
3 detik	1	0	31	0,0
	2	0	105	0,0
	Rata-rata			0,0
Kontrol		508	39	92,9



Gambar 1. Produk amplifikasi PCR dari DNA yang diekstraksi dari embrio yang dimikroinjeksi pada 14 jam setelah diinjeksi. Lajur 1-2: 1 detik injeksi, lajur 3-4: 2 detik injeksi, lajur 5-6: 3 detik injeksi, lajur 7: produk PCR tanpa DNA template, and lajur 8 adalah produk PCR dengan plasmid pktBP-ktGH sebagai template. M adalah 2-log ladder DNA marker (BioLabs, Inc., New England).

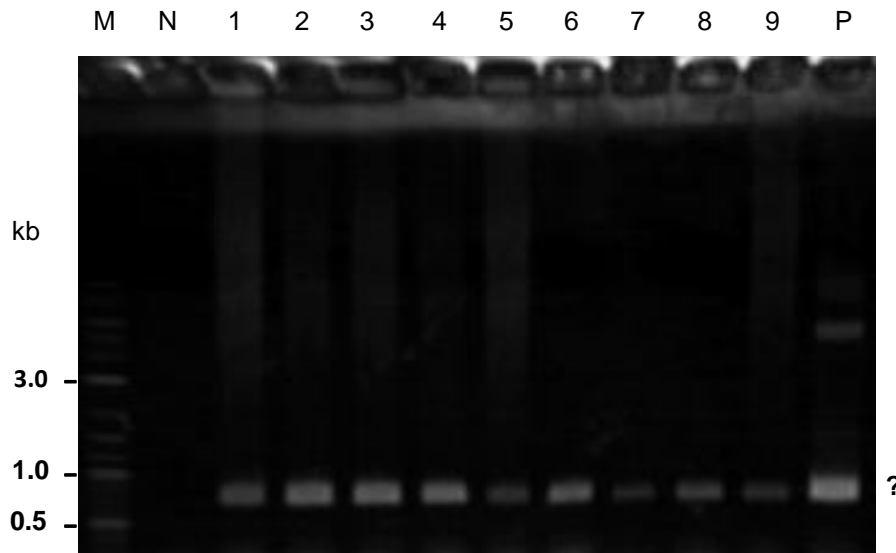
Elektroporasi

Hasil uji coba menggunakan metode elektroporasi memperlihatkan bahwa semua sperma membawa pktBP-ktGH dan spermanya motil (Tabel 2). Tidak ada perbedaan tingkat motilitas antara sperma kontrol dan hasil elektroporasi, serta sperma dapat aktif selama 5–10 menit. Oleh karena itu, sperma hasil elektroporasi diduga dapat membuahi sel telur seperti halnya sperma kontrol. Persentase motilitas sperma yang dielektroporasi dengan menggunakan konsentrasi DNA 5 µg/ml lebih rendah (90%), jika dibandingkan dengan sperma pada dua perlakuan lainnya (100%).

Perbedaan volume air yang kecil di dalam larutan DNA, kemungkinan menjadi penyebab menurunnya tingkat persentase motilitas sperma pada DNA (konsentrasi 5 µg/ml) yang berbeda dengan perlakuan lainnya. Tingkat *droop* pada saat menggunakan kuvet 0,2 cm, terlihat lebih tinggi (6–12%) jika dibandingkan dengan kuvet 0,4 cm (0–6%). Namun demikian, perbedaan *droop* tidak mempengaruhi motilitas sperma (Tabel 2). *Droop* adalah fungsi penurunan voltase akhir dan awal (V_0-V_t) dari voltase awal (V_0) (Anonymous, 2006).

Tabel 2. Voltase aktual, *droop* dan persentase motilitas sperma pada metode elektroporasi yang menggunakan berbagai konsentrasi DNA dan ukuran kuvet.

Konsentrasi DNA (µg/ml)	Ulangan	Setting Voltage (volt)	Cuvette gap (cm)	Actual voltage (volt)	Droop (%)	Motilitas Sperma (%)
5	1	50	0,4	37	6	90
	2	50	0,4	37	0	90
	3	50	0,2	37	12	90
10	1	50	0,4	37	6	100
	2	50	0,4	37	6	100
	3	50	0,4	37	0	100
20	1	50	0,2	37	12	100
	2	50	0,2	37	12	100
	3	50	0,2	37	6	100



Gambar 2. Produk amplifikasi PCR ekstraksi DNA hasil selektroporasi sperma kerapu tikus. Lajur 1–3: konsentrasi DNA 20 $\mu\text{g/ml}$, lanes 4–6: konsentrasi DNA 10 $\mu\text{g/ml}$, lajur 7–9: konsentrasi DNA 5 $\mu\text{g/ml}$. M adalah 2–log ladder DNA marker (BioLabs, Inc., New England). N adalah produk PCR tanpa DNA. P adalah produk PCR dengan plasmid pktBP–ktGH.

Analisis PCR memperlihatkan bahwa semua sperma hasil elektroporasi mengandung pktBP–ktGH (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa parameter dalam metode elektroporasi tersebut dapat mengantarkan DNA asing masuk ke dalam sperma. Hasil analisis semikuantitatif PCR (Gambar 2) menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi DNA pada metode elektroporasi, maka semakin tebal pita hasil PCR. Hal ini mengindikasikan 3 kemungkinan, yaitu (1) Jumlah DNA asing yang masuk pada sperma meningkat, (2) jumlah sperma yang membawa DNA asing, atau jumlah DNA dalam sperma meningkat dan (3) jumlah sperma yang membawa DNA asing meningkat. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk membuktikan kemungkinan mana yang terjadi.

Volume semen (25 μl setara dengan 175 juta spermatozoa) yang digunakan pada metoda elektroporasi ini pada setiap perlakuan adalah sama, sehingga semakin tinggi konsentrasi DNA akan semakin banyak copy DNA asing pada sperma. Dengan demikian akan semakin banyaknya copy gen asing pada sperma. Hal ini akan meningkatkan kemungkinan gen asing masuk ke genom sperma atau telur setelah terjadi pembuahan. Selanjutnya, bila peningkatan DNA yang digunakan dalam hidup (Alimuddin *et al.*, 2005; Alimuddin *et al.*, 2008). Jika diasumsikan bahwa jumlah serupa

elektroporasi dapat meningkatkan jumlah sperma yang membawa DNA tersebut, serta melalui pembuahan telur menggunakan sperma tersebut, maka peluang diperoleh ikan transgenik F0 semakin besar.

Mikroinjeksi biasanya digunakan untuk memproduksi ikan transgenik. Seperti ditunjukkan pada Gambar 1, embrio yang telah diinjeksi mampu membawa gen asing minimal selama 14 jam setelah penyuntikan (stadia embrio sempurna). Namun demikian, pada uji coba ini daya tetas telur yang telah dimikroinjeksi sangat rendah. Seperti ikan laut lainnya, telur kerapu tikus bersifat mengambang dan ukurannya kecil, serta blastodisknya terlihat transparan (tidak jelas terlihat). Hal ini menjadi penghambat dalam melakukan mikroinjeksi. Selain itu, selama pembelahan sel awal hingga mencapai 4 sel embrio ikan kerapu membutuhkan waktu sekitar 20–30 menit setelah pemijahan, sehingga jumlah embrio yang dapat disuntikan oleh seorang operator mikroinjektor menjadi sangat terbatas yaitu hanya 60–100 embrio. Tingkat penetasan embrio yang tidak dimikroinjeksi tinggi, namun sebaliknya tingkat kelangsungan hidup larva lebih rendah atau rata-rata 5–10%. Berdasarkan hasil penelitian pada ikan zebra transgenik, jumlah transgenik *germline* F0 adalah sekitar 2–4% dari ikan yang *germlin* F0 pada ikan zebra dapat dicapai pada kerapu tikus, maka untuk memperoleh F0

transgenik jumlah embrio yang disuntikan setidaknya berjumlah 1.000 butir. Ini berarti bahwa dengan metode mikroinjeksi harus dilakukan 10 kali lipat, atau diperlukan lebih banyak jumlah mikroinjektor dan operatornya. Dengan demikian, penggunaan teknik mikroinjeksi pada kerapu tikus membutuhkan fasilitas dan tenaga kerja-ekstensif lebih banyak, serta menyita waktu.

Keberhasilan teknik *sperm-mediated gene transfer* (SMGT) untuk memproduksi ikan laut transgenik telah dilakukan oleh Lu *et al.* (2002) dan Sun *et al.* (2004). Pada penelitian ini juga digunakan teknik SMGT dengan menggunakan metode elektroporasi. Metode elektroporasi telah dilaporkan sebagai metode yang sederhana dan metode produksi ikan transgenik secara massal. Metode ini juga telah dilakukan untuk memproduksi ikan transgenik seabream (Lu *et al.*, 2002). Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2, semua perlakuan sperma membawa DNA asing. Berdasarkan tingkat motilitas sperma dan hasil analisis PCR, konsentrasi DNA 10 µl/ml merupakan konsentrasi yang optimum dalam metode elektroporasi pada ikan kerapu tikus. Konsentrasi DNA ini lebih rendah dari pada untuk ikan seabream, sebesar 25 µl/ml (Lu *et al.*, 2002). Voltase (50V) juga lebih rendah dibandingkan untuk ikan seabream. Elektroporasi untuk ikan *seabream* menggunakan parameter 600–2000 V. Diduga setiap spesies mempunyai spesifikasi parameter elektroporasi yang berbeda. Dalam proses elektroporasi waktu yang diperlukan sangatlah singkat dan diperlukan jumlah operator yang sedikit. Dengan demikian, penggunaan teknik elektroporasi pada ikan kerapu tikus tidak membutuhkan keterampilan yang khusus dan tidak membutuhkan tenaga kerja-ekstensif serta tidak menyita waktu.

Sampai saat ini, pengkajian dan kegiatan pembuatan ikan kerapu tikus transgenik tumbuh cepat dengan menggunakan metode elektroporasi masih dilakukan di laboratorium Bioteknologi BBAP Situbondo. Dalam rangka mendukung kegiatan transgenesis pada ikan kerapu tikus, setelah transfer gen hormon pertumbuhan dengan menggunakan metode elektroporasi ini berhasil, tahapan selanjutnya adalah perlu dikembangkan metode pembuahan buatan ikan kerapu tikus dengan menggunakan sperma yang telah membawa gen hormon pertumbuhan (pktBP-ktGH) sebagai media transfer gen (*sperm mediated gene transfer*, SMGT) ke sel telur ikan kerapu tikus untuk bisa menghasilkan benih yang dijadikan induk kerapu tikus transgenik (F0). Selanjutnya dari induk F0 tersebut disilangkan dengan ikan normal sehingga akan menghasilkan benih dan dijadikan induk ikan kerapu tikus transgenik F1

heterosigot, dari induk F1 ini kemudian diseleksi yang mempunyai karakter laju pertumbuhannya tinggi kemudian disilangkan dengan induk dalam satu kelompok dan akan menghasilkan induk ikan kerapu tikus transgenik F2 homosigot. Produksi benih dari induk F2 homosigot kemudian dijadikan induk F3 dan kemudian menghasilkan benih sebar sebagai benih ikan kerapu tikus transgenik yang pertumbuhannya cepat sesuai yang diharapkan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji coba ini dapat disimpulkan bahwa metode mikroinjeksi dan elektroporasi dapat digunakan dalam transfer gen ikan kerapu tikus, namun metode elektroporasi merupakan metode transfer gen yang paling efektif dan efisien jika dibandingkan dengan metode mikroinjeksi untuk ikan kerapu tikus. Sedangkan konsentrasi DNA yang optimum pada metode elektroporasi pada ikan kerapu tikus adalah 10µg/µl.

Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas dapat disarankan bahwa, agar bisa mendapatkan hasil yang terbaik dalam transfer gen hormon pertumbuhan ikan kerapu tikus maka perlu menerapkan metode elektroporasi dengan konsentrasi DNA sebesar 10 µg/ml, sedangkan parameter elektroporasinya adalah voltase 50 V, volume sperma 10 µl, lama kejut 30 ms, jumlah kejutan 5, interval kejutan 0,1 µs, dan ukuran kuvet 0,4 cm. Dalam rangka mendukung aplikasi transgenesis pada ikan kerapu tikus melalui elektroporasi sperma, perlu kiranya dilakukan pengembangan teknik pembuahan buatan agar metode ini selanjutnya dapat dipergunakan secara maksimal.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami menyampaikan terima kasih kepada Tim Peneliti RUSNAS (Riset Unggulan Strategis Nasional-BPPT) atas konstruksi gen pktBP-ktGH, Ketua Departemen Budidaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB atas dukungan fasilitas laboratoriumnya, dan Pimpinan serta Staf BBAP Situbondo khususnya Tim Induk kerapu atas bantuan dan kerjasamanya sehingga uji coba kami ini bisa berjalan dengan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin, Kiron V, Satoh S, Takeuchi T, and Yoshizaki G. 2008. Cloning and over-expression of a masu aalmon (*Oncorhynchus masou*) fatty acid elongase-like gene in zebrafish. *Aquaculture*, 282: 13–18.
- Alimuddin, Yoshizaki G, Kiron V, Satoh S and Takeuchi T. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon $\Delta 6$ -desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Research*, 14: 159–165.
- Anonymous, 2006. Instruction manual gene pulser xcell electroporation system, biorad catalog number 74, biorad office.
- Ath-Thar M.F. 2007. Efektivitas promoter b-aktin ikan medaka *Oryzias latipes* dengan penanda gen hrGFP (*humanized Renilla reniformis Green Fluorescent Protein*) pada ikan lele *Clarias* sp. keturunan F0. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Cesar H and Hempel E. 2000. Opportunities and constraints of grouper aquaculture in Asia. EASES Discussion Paper Series, East Asia Environment and Social Development Unit. World Bank. 26 p.
- Chen T.T, Lu J-K, and Kight K. 1995. Transgenic fish. In : "Molecular Biology and Biotechnology" (ed by Meyers, R.A). VCH Publishers, Inc. pp 910–914.
- Chen T.T, Kight K, Lin C.M, Powers D.A, Hayat M, Chatakondi N, Ramboux A.C, Duncan P.L, and Dunham R.A. 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Biol. Biotechnol.*, 2: 88–95.
- Devlin R.H, Yesaki T.Y, Donaldson E.M, Du S.J and Hew C.L. 1995. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 52: 1376–1384.
- Dunham R.A, J. Eash, J. Askins, T.M. Townes. 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish Soc.* 116: 87-91.
- Esponda P. 2005. Transfection of Gametes: a method to generate transgenic animal. *Int. J. Morphol*, 23 (3): 281–285.
- Hackett P.B. 1993. The molecular biology of transgenic fish. In: Hocachka and Mommesen (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2: 218–221. Elsevier Science Publishers BV.
- Kobayashi S, Alimuddin, Morita T, Miwa M, Lu J, Endo M, Takeuchi T, and Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile tilapia *Oreochromis niloticus* over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270: 427–435.
- Liu Z, Moav B, Faras A.J, Guise K.S, Kapuscinski A.R, Hackett P.B. 1990. Development of expression vector for transgenic fish. *Bio/Technology*, 8: 1268–1272.
- Lu J-K, Fu B-H, Wu J-L and Chen T.T. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.*, 4: 328–337.
- Martinez R, Estrada M.P, Berlanga J, Guillen I, Hernandez O, Cabrera E, Pimentel R, Morales R, Herrera F, Morales A, Pina J.C, Abad Z, Sanchez V, Melamed P, Leonart R, and de la Fuente J. 1996. Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol.Mar. Biol. Biotechnol.* 5:62–70.
- Nam Y.K, Noh J.K, Cho Y.S, Cho H.J, and Cho K.N. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loch *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* 10:353–362.
- Patil J.G, and Khoo H.W. 1996. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation, *J. Exp. Zool.* 274: 121–129.
- Pinkert C.A, Irwin M.H, and Moffatt R.J. 1995. Transgenic animal modeling. In: *Molecular Biology and Biotechnology*.

- Meyers, R.A (ed.). VCH Publisher, Inc. pp 901–907.
- Rahman M.A and McLean N. 1992. Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mo. Mar.Biol. Biotechnol.* 1:286–289.
- Rambubu K.M, Rao S.H.N and Rao N.M. 2005. Efficient expression of transgene in adult zebrafish by electroporation. *BMC Biotechnology*, 5:29.
- Sarmasik A, Jang I.K, Chung C.Z, Lu J.K, and Chen T.T. 2001. Transgenic live-bearing fish and crustacean produced by transforming immature gonads with replication-defective pantropic retroviral vector. *Mar. Biotechnol.*, 3: 470–477.
- Sarmasik A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of Fish. *Turk. J. Zool.* 27:1–6.
- Sin F.Y.T, Bartley A.L, Walker S.P, Sin I.L, Symonds J.E, Hawke L and Hopkins C.L. 1993. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsca*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-laZ DNA. *Aquaculture*, 111:57–69.
- Sin F.Y.T, Walker S.P, Symonds J.E and Sin I.L. 1994. Sperm-mediated gene transfer in chinook salmon. Online Symposium Paper, International Congress of Fish Biology. Vancouver-Canada, 360–365. [www.biology-browser.org/bb / Subject/.../index251. shtml](http://www.biology-browser.org/bb/Subject/.../index251.shtml). August 14, 2009.
- Sun P.S, Venzon J.N.C, Calderon F.R.O and Esaki D.M. 2005. Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 243: 19-26.
- Symon J.E, Walker S.P, Sin F.Y.T and Sin L. 1994. Development of a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:104–111.
- Teitelbaum A. 2007. Pacific Islanders gain specific know-how on grouper hatchery techniques. http://www.spc.int/coastfish/News/Fish_News/121/Teitelbaum121.pdf. SPC Fisheries Newsletter #121–April/June 2007
- Tim RUSNAS Induk dan Benih. 2007. Laporan akhir riset Unggulan Strategis Nasional: pembenihan dan perbaikan mutu genetik ikan kerapu. Pusat Teknologi Produksi Pertanian, Kedepujian Bidang Teknologi Budidaya Agroindustri dan Bioteknologi. Kementerian Negara Riset dan Teknologi, Republik Indonesia. 78 p.
- Tsai H.J, Lai C.H and Yang H.S. 1997. Sperm as carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of japa-nesse abalone (*Haliotis deversi-color supertexta*). *Transgenic Research*, 6:85–95.
- Tucker J. and John W. 1999. Species Profile Grouper Aquaculture. SRAC Publication No. 721. <http://www.ca.uky.edu/wkrec/GrouperAquaculture.pdf>