

Performa reproduksi ikan mas (*Cyprinus carpio* L) jantan transgenik hormon pertumbuhan generasi kedua

Kurdianto¹, Alimuddin², Nurly Faridah³, Odang Carman²

¹ Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor 16680

² Laboratorium Genetika dan Reproduksi Organisme Akuatik, Departemen Budi daya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB

³Laboratorium Genetika Ikan, Balai Besar Perikanan Budi daya Air Tawar (BBPBAT), Sukabumi, Jawa Barat

Surel: kurdianto.genetics@hotmail.com

Abstrak

Fertilitas dan viabilitas merupakan parameter dalam evaluasi keamanan lingkungan dan penentu potensi budi daya organisme transgenik. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi performa reproduksi ikan mas jantan transgenik hormon pertumbuhan (*growth hormone*/GH) pada generasi kedua (F2). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan (transgenik, dan non-transgenik) dan tiga ulangan. Tiga ekor ikan mas jantan transgenik GH (TGJ) dan tiga non-transgenik (NTJ) disilangkan dengan dua ekor betina non-transgenik (NTB), menghasilkan 12 famili. Parameter yang diamati adalah volume semen, motilitas, durasi motilitas, jumlah sel sperma, derajat kelangsungan hidup embrio, derajat penetasan, kelangsungan hidup larva hingga umur 3 hari, morfologi sperma, dan larva. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai volume semen ikan TGJ dan kelangsungan hidup juvenil umur 30 hari lebih besar dibandingkan dengan ikan NTJ ($p < 0,05$), sedangkan nilai motilitas, durasi motilitas, jumlah sel sperma, derajat kelangsungan hidup embrio, derajat penetasan, dan kelangsungan hidup larva menunjukkan hasil yang sama ($p > 0,05$). Selanjutnya, morfologi sperma TGJ dan larva baru menetas hasil persilangan TGJ x NTB adalah sama dengan NT. Sebagai kesimpulan, performa reproduksi ikan mas transgenik GH jantan tergolong baik dan tidak berbeda dengan ikan non-transgenik.

Kata kunci: ikan mas, transgenik, induk jantan, performa reproduksi

Pendahuluan

Ikan mas merupakan salah satu spesies penting dalam budi daya air tawar dunia. Aplikasi teknologi transgenesis menggunakan gen hormon pertumbuhan (*growth hormone*/GH) telah dilakukan untuk menghasilkan *fast-growing fish*. Ikan mas transgenik telah diproduksi menggunakan gen GH *rainbow trout* (Zhang *et al.* 1990), *human growth hormone* (Zhu *et al.* 1989), dan *Cyprinus carpio growth hormone* (Hew & Fletcher 2001) dengan menghasilkan peningkatan pertumbuhan sebesar 1,1-3,7 kali (Hew & Fletcher 2001). Di Indonesia ikan mas transgenik GH telah diproduksi oleh Faridah (2012) menggunakan gen GH ikan nila (*tiGH*) dan menghasilkan pertumbuhan rata-rata 1,87 kali lebih cepat pada generasi pertama.

Performa ikan transgenik termasuk performa reproduksi sangat menentukan potensi produksi benih oleh pembudidaya, dan potensi dominansi dalam ekosistem apabila terlepas ke perairan umum. Beberapa riset telah melaporkan tingkat viabilitas ikan transgenik termasuk karakteristik nafsu makan dan perilaku makan (Fu *et al.* 2007), kemampuan berenang (Lee *et al.* 2003), karakteristik metabolisme, dan mortalitas benih (Sudstrom *et al.* 2004). Studi mengenai tingkat fertilitas ikan transgenik difokuskan pada indeks gonad ikan, waktu pertama matang gonad, volume sperma, motilitas sperma, dan perilaku pemijahan (Fitzpatrick *et al.* 2011). Walaupun tingkat pertumbuhan yang

cepat dapat meningkatkan produksi, pendapatan, mengurangi lama siklus produksi, dan meningkatkan efisiensi penggunaan pakan; implementasi teknologi *fast-growing fish* terkait isu lingkungan perlu diperhatikan (Pandian & Marian 1994).

Sebagian peneliti mengindikasikan efek *Trojan gene hypotesis* kemungkinan dapat terjadi apabila ikan transgenik fertil bereproduksi dengan ikan yang ada di alam dan berujung pada kepunahan populasi alam secara perlahan (Howard *et al.* 2004). Hipotesis tersebut memprediksi karena fertilitas ikan transgenik lebih unggul dan viabilitas juvenil rendah, kemungkinan populasi transgenik dan alam akan punah setelah 50 generasi (Muir & Howard 1999). Fertilitas dan viabilitas ikan transgenik merupakan kunci utama dalam mengevaluasi keamanan ekologis ikan transgenik (Devlin & Donaldson 1992). Informasi mengenai performa reproduksi ikan transgenik, khususnya ikan mas masih sedikit dilaporkan.

Bahan dan metode

Ikan uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan mas (*Cyprinus carpio* L) jantan transgenik generasi kedua dengan bobot $310 \pm 0,102$ gram, jantan non-transgenik dengan bobot $650 \pm 0,102$ gram yang berumur 1 tahun, dan betina non-transgenik dengan bobot $705 \pm 0,125$ gram berumur 2 tahun yang berasal dari Balai Besar Pengembangan Budi daya Air Tawar, Sukabumi, Jawa Barat. Induk jantan transgenik GH yang digunakan merupakan individu yang memiliki nilai ekspresi gen *tiGH* lebih tinggi dibandingkan ikan transgenik lainnya. Bobot ikan mas jantan transgenik lebih rendah daripada non-transgenik karena dipelihara pada luasan wadah dan kepadatan yang berbeda. Ikan transgenik dipelihara di bak khusus, sedangkan ikan non-transgenik dipelihara di kolam tanah. Ikan tersebut diberi pakan komersial dengan kadar protein 36%.

Perangsangan ovulasi dan koleksi gamet

Perangsangan ovulasi pada induk betina dilakukan melalui penyuntikan ova-prim dengan dosis 0,5 ml/kg bobot secara intramuskular (bagian punggung), sedangkan induk jantan disuntik *Ovaprim* dengan dosis 0,2 ml/kg. Perangsangan ovulasi dilakukan untuk memastikan ikan mengalami ovulasi pada waktu yang diinginkan. *Stripping* untuk mendapatkan sel telur dilakukan 8-10 jam setelah penyuntikan dan induk sudah mulai memijah secara alami. Telur yang telah diambil dimasukkan ke dalam mangkok plastik yang steril dan diberi 500 μ L larutan fisiologis (NaCl 0,9%) agar telur tidak menempel pada bagian samping wadah. Koleksi sperma dilakukan dengan *stripping* dan dimasukkan dalam cawan petri hingga sperma tidak keluar lagi.

Karakterisasi sperma

Induk jantan ditimbang menggunakan timbangan digital sebelum dan setelah *stripping* sperma. Cairan sperma dikeluarkan hingga tidak keluar lagi saat proses *stripping*, kemudian volume cairan sperma diukur menggunakan *syringe* 10 ml. Penentuan skor motilitas sperma dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x mengacu pada penelitian Guest *et al.* (1986). Cairan sperma diteteskan pada gelas objek sebanyak 1 μ L dan di samping cairan sperma tersebut diteteskan juga akuades. Setelah sel

sperma terlihat pada bidang pandang dan sperma tidak dalam kondisi motil, akuades dicampurkan menggunakan tusuk gigi. Pengamatan motilitas dilakukan pada setiap sampel sperma ikan jantan dengan 3 kali pengukuran pada setiap sampel. Durasi motilitas sperma diamati bersamaan dengan penentuan skor motilitas sperma. Pengamatan lama motilitas sperma dilakukan dengan mencatat waktu sperma bergerak hingga 100% sperma tidak bergerak lagi. Penghitungan jumlah sel sperma dilakukan menggunakan hemositometer dan mikroskop dengan perbesaran 100x (obyektif 10x). Cairan semen diencerkan 1000 kali menggunakan larutan fisiologis (cairan infus NaCl 0,9%), kemudian diambil 1 μ L dan diteteskan pada hemositometer untuk dihitung jumlah sel spermanya.

Pengamatan sperma dan larva

Pengamatan morfologi sperma dilakukan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk kepala, ekor, dan abnormalitas pada preparat sperma. Untuk mempermudah proses pengukuran, dilakukan pemotretan terhadap preparat sperma di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan morfologi larva dilakukan dengan menggunakan mikroskop stereo (*Olympus SZX16* yang dilengkapi dengan kamera *Olympus DP 20*) dengan perbesaran 2,5 kali. Hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan kamera yang terhubung langsung dengan komputer. Pengamatan dilakukan pada suhu ruang 25-26°C.

Penetasan telur dan pemeliharaan larva

Sebanyak 500 μ L semen yang telah diencerkan dicampur dengan 2 sudip telur ikan mas, kemudian diinkubasi dalam akuarium berukuran 80 x 60 x 40 cm³ yang telah berisi air dan diberi *methylene blue*. Akuarium dilengkapi dengan aerasi berintensitas sedang dan suhu inkubasi telur berkisar antara 24-26°C. Larva yang telah menetas dipelihara di akuarium berukuran 80 x 60 x 40 cm³ pada suhu 24-26°C dengan kepadatan 3 ekor/liter. Setelah kuning telur habis, presentase larva yang hidup dihitung. Pemeliharaan larva dilakukan dengan pemberian pakan alami berupa nauplius *Artemia* secara *ad libitum* yang dimulai pada hari ke-4 (setelah kuning telur habis) hingga hari ke-10. Larva diberi pakan cacing *Tubifex* mulai hari ke-10 sampai hari ke-20, setelah larva berumur 20 hari ikan diberi pakan Fenglii-1 dengan frekuensi tiga kali sehari. Larva dipelihara hingga berumur 30 hari dan dihitung kelangsungan hidupnya pada hari ke-30. Air diganti sebanyak 50% setiap dua hari sekali untuk mempertahankan kualitas air tetap baik.

Parameter uji dan analisis data

Parameter yang diamati meliputi volume sperma, motilitas sperma, durasi motilitas sperma, jumlah sel sperma, derajat fertilisasi (DF), derajat penetasan (DP), kelangsungan hidup larva (KH), dan morfologi sperma dan larva. Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik dan dianalisis secara statistik menggunakan *independent samples t-test* pada SPSS 16.0 dengan selang kepercayaan 95% .

Hasil

Kuantitas dan kualitas sperma

Kuantitas dan kualitas sperma ikan mas transgenik dan non-transgenik disajikan pada Tabel 1. Volume semen ikan jantan transgenik lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan ikan non-transgenik, sedangkan nilai motilitas sperma, durasi motilitas, dan jumlah sperma ikan transgenik sama dengan ikan non-transgenik ($p > 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa derajat fertilitas, derajat penetasan, dan kelangsungan hidup larva ikan transgenik dan non-transgenik setelah kuning telur habis adalah sama (Tabel 1; $p > 0,05$). Namun demikian, nilai kelangsungan hidup juvenil keturunan ikan transgenik pada umur 30 hari lebih besar dibandingkan dengan ikan non-transgenik ($p < 0,05$).

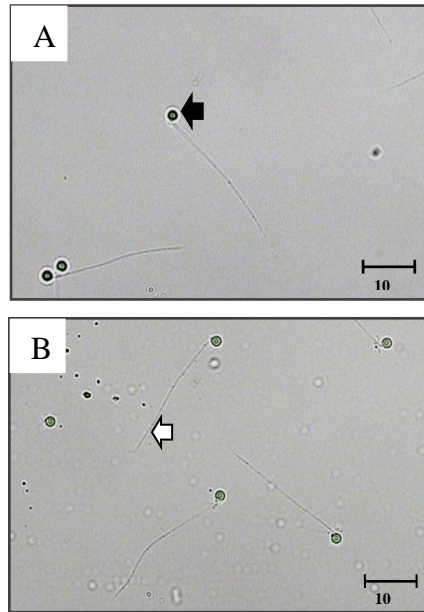
Morfologi sperma dan larva



Berdasarkan hasil pengamatan morfologi pada 10 sampel sperma ikan transgenik dan non-transgenik pada pembesaran 400x menggunakan mikroskop okuler tidak terlihat adanya perbedaan morfologi ataupun kecacatan pada sperma yang diamati (Gambar 1). Sperma ikan mas terdiri atas bagian kepala dan bagian ekor. Kepala sperma ikan mas berbentuk bulat. Panjang ekor sperma ikan transgenik ($26,154 \pm 0,628 \mu\text{m}$) sama dengan ikan non-transgenik ($26,155 \pm 0,771 \mu\text{m}$). Diameter kepala sperma ikan transgenik ($1,949 \pm 0,036 \mu\text{m}$) juga sama dengan ikan non-transgenik ($1,974 \pm 0,036 \mu\text{m}$).

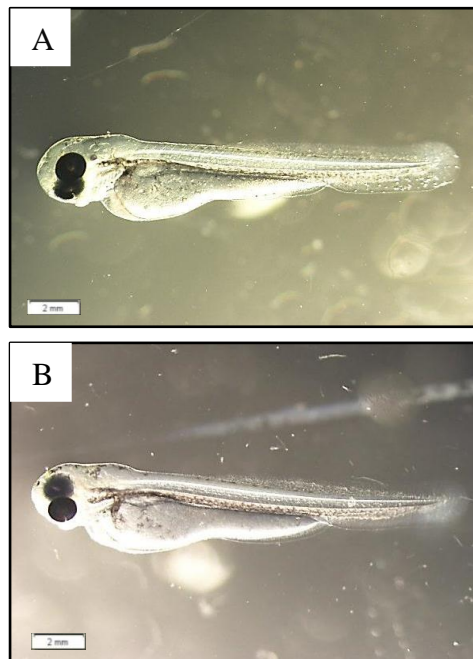
Larva menetas sekitar 46 jam setelah proses fertilisasi. Pengamatan secara visual menggunakan mikroskop menunjukkan bahwa morfologi larva ikan transgenik dan non-transgenik yang diamati sesaat setelah penetasan adalah sama (Gambar 2). Panjang total rata-rata ($n=5$ ekor) larva ikan transgenik ($17,69 \pm 0,646 \text{ mm}$) relatif sama dengan larva non-transgenik ($17,57 \pm 0,656 \text{ mm}$).

Tabel 1. Nilai volume sperma, motilitas sperma, durasi motilitas, jumlah sel sperma, derajat fertilitas, derajat penetasan dan kelangsungan hidup larva ikan transgenik dan non-transgenik

Parameter	Ikan Uji	
	Transgenik	Non-transgenik
Volume semen (ml/kg)	21,21 \pm 2,95 ^a	6,43 \pm 1,31 ^b
Motilitas sperma (%)	96,83 \pm 0,47 ^a	95,67 \pm 1,03 ^a
Durasi motilitas (menit)	2,81 \pm 0,22 ^a	2,78 \pm 0,39 ^a
Jumlah sel sperma($\times 10^9$ sel/ml)	10,97 \pm 1,35 ^a	9,7 \pm 1,17 ^a
Derajat fertilitas (%)	46,72 \pm 7,68 ^a	59,17 \pm 8,58 ^a
Derajat penetasan (%)	94,41 \pm 0,67 ^a	95,09 \pm 0,41 ^a
Kelangsungan hidup larva setelah kuning telur habis (%)	98,22 \pm 0,77 ^a	97,44 \pm 0,69 ^a
Kelangsungan hidup juvenil hari ke-30 (%)	76,72 \pm 6,37 ^a	48,98 \pm 10,24 ^b



Gambar 1. Sperma ikan mas transgenik generasi kedua (A), dan non-transgenik (B) pada pembesaran 400x yang terdiri atas bagian kepala ( dan ekor ()



Gambar 2. Morfologi larva ikan mas transgenik sesaat setelah penetasan (A) dan non-transgenik (B) pada pembesaran 2,5 kali dengan mikroskop stereo.

Pembahasan

Volume semen, dan total sel sperma ($(23,2 \pm 1,35) \times 10^{10}$ sel/kg) induk ikan transgenik lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan dengan ikan non-transgenik (Tabel 1). Dengan demikian, ekspresi gen *tiGH* pada ikan mas transgenik meningkatkan proses pembentukan sel sperma. Mekanismenya diduga melalui induksi sekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) yang mengatur proses spermatogenesis. Hal

ini telah dilaporkan oleh Chandrashekar *et al.* (1999) bahwa GH memengaruhi sekresi FSH dan LH. Sekresi hormon LH juga dilaporkan lebih tinggi pada tikus transgenik (Bartke *et al.* 1996).

LeGac *et al.* (1996) melaporkan bahwa ditemukan ekspresi mRNA dan reseptor IGF-1 pada sel sertoli ikan *rainbow trout*, dan testis ikan nila (Berishvili *et al.* 2006). IGF-1 juga memiliki peran dalam proses proliferasi dan diferensiasi spermatogonia (Vinas & Piferrer 2008), menstimulasi sintesis DNA pada spermatogonia (LeGac *et al.* 1996), dan menginduksi aksi hormon 11-ketotestosteron pada proses spermatogenesis *Japanese eel* (*Anguilla japonica*) (Nader *et al.* 1999).

Jumlah sel sperma per satuan bobot ikan transgenik jantan $(23,2 \pm 13,5) \times 10^{10}$ sel/kg adalah lebih tinggi daripada ikan mas non-transgenik $(6,28 \pm 1,17) \times 10^{10}$ sel/kg. Ali-niya *et al.* (2013) melaporkan jumlah sel sperma ikan mas per ml semen adalah 17,6-24,6 ($\times 10^9$ sel/ml) pada ikan mas berumur 2-3 tahun. Perbedaan hasil penelitian ini dengan nilai pada literatur akibat adanya perbedaan umur ikan yang digunakan. Pada penelitian ini, ikan mas transgenik dipelihara di bak resirkulasi *indoor* yang berukuran $4 \times 2 \times 1$ m³ dengan padat tebar 21 ekor/m³, sedangkan ikan mas non-transgenik dipelihara di hapa *outdoor* yang berukuran $6 \times 6 \times 2$ m³ dengan padat tebar 2 ekor/m³, diberi pakan dengan kadar protein yang sama (kadar protein 36%). Perbedaan kondisi lingkungan tersebut diduga memengaruhi proses spermatogenesis dan jumlah sel sperma. Selanjutnya, jumlah total sperma ikan transgenik yang lebih tinggi diduga akan meningkatkan keberhasilan pembuahan telur khusus dalam pemijahan ikan secara alami. Prediksi tersebut sejalan dengan pernyataan Dadras *et al.* (2011) untuk ikan *Persian sturgeon* (*Acipenser persicus*), dan hal ini perlu dibuktikan pada penelitian selanjutnya.

Derajat motilitas sperma ikan transgenik memiliki nilai yang sama ($p > 0,05$) dengan ikan non-transgenik, yakni skor 4-5. Nilai tersebut termasuk dalam kategori kualitas sperma yang baik (Guest *et al.* 1976). Skor 4-5 artinya banyak sperma bergerak sangat cepat dengan pergerakan ekor cepat. Billard (1978) menambahkan bahwa motilitas sperma dapat dijadikan acuan dalam melihat kualitas dan kemampuan fertilisasi sperma. Pada penelitian ini kualitas sperma yang sama antara ikan mas transgenik dan non-transgenik ditunjukkan juga oleh morfologi dan durasi motilitas (Tabel 1) serta derajat pembuahan yang sama ($p > 0,05$). Selanjutnya derajat penetasan telur yang sama menunjukkan kualitas telur yang digunakan adalah sama, baik yang dibuahi oleh sperma ikan transgenik maupun ikan non-transgenik. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa ekspresi GH pada ikan mas tidak memengaruhi kualitas sperma.

Durasi motilitas sperma ikan transgenik memiliki nilai yang sama ($p > 0,05$) dengan ikan non-transgenik, yakni sekitar 2-3 menit. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ginzburg (1968), bahwa durasi motilitas pada ikan yang memijah di air tawar tidak lebih dari 2-3 menit. Durasi motilitas ikan mas telah dilaporkan sebelumnya oleh Elster & Mann (1952) selama 120 detik pada suhu 20-21°C, 3 menit (Suzuki 1959), dan 90-180 detik (Musselius 1951) pada suhu 18-21°C. Motilitas dan durasi motilitas sperma dipengaruhi oleh konsentrasi ion (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), tekanan osmotik, pH, suhu, dan tingkat pengenceran (Cosson *et al.* 2000).

Pada jumlah sampel yang diamati, tidak ditemukan larva yang abnormal sesaat setelah proses penetasan pada ikan transgenik dan non-transgenik. Selanjutnya, kelang-

sungan hidup larva setelah kuning telur habis pada ikan transgenik dan non-transgenik adalah sama ($p > 0,05$), sedangkan kelangsungan hidup juvenil ikan transgenik pada umur 30 hari lebih tinggi dibandingkan dengan ikan non-transgenik ($p < 0,05$). Kelangsungan hidup yang lebih tinggi pada ikan transgenik diduga akibat sistem imun dan ketahanan tubuh yang lebih baik dibandingkan dengan ikan non-transgenik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Takashima (2007), bahwa GH dapat meningkatkan fungsi sistem imun termasuk sistem imun non-spesifik, aktivitas sitotoksik, fagositik, haemolitik, dan lisozim. Ling *et al.* (2009) menambahkan bahwa ikan mas transgenik GH F4 memiliki level infeksi yang lebih kecil saat diuji tantang dengan *Ichthyophthirius multifiliis* dibandingkan ikan kontrol. Pada penelitian ini benih ikan mas transgenik dan non-transgenik dipelihara pada kondisi yang sama, tidak diuji tantang dengan penyakit. Namun demikian, selama pemeliharaan berlangsung terdapat serangan penyakit pada ikan uji dengan gejala berupa geripis pada ekor, sebagian tubuh memutih, dan terjadi hemoragi pada bagian tubuh ikan uji. Dengan demikian, kelangsungan hidup juvenil ikan mas transgenik yang lebih tinggi diduga terkait dengan over-ekspresi *tiGH* yang menginduksi sistem pertahanan tubuh non-spesifik. Selain itu, daya tahan tubuh dan kelangsungan hidup yang tinggi sangat berguna dalam akuakultur.

Trojan gene hypothesis yang dicetuskan oleh Muir & Howard (1999) mengasumsikan bahwa ikan transgenik GH akan memiliki ukuran yang jauh berbeda dengan ikan kontrol sehingga mendominasi proses perkawinan di alam. Pada penelitian ini pemijahan dilakukan secara buatan, sehingga pada penelitian selanjutnya perlu memijahkan ikan mas transgenik secara alami. Selain itu Muir & Howard (1999) memprediksi bahwa akibat fertilitas ikan transgenik lebih unggul dan viabilitas juvenil rendah, kemungkinan populasi ikan transgenik dan populasi alam akan punah setelah 50 generasi. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan nilai fertilitas ikan mas transgenik adalah sama dengan ikan non-transgenik, tetapi kelangsungan hidup juvenil ikan transgenik lebih tinggi pada keturunan ikan transgenik ($p < 0,05$). Hasil serupa dengan yang dilaporkan oleh Lian *et al.* (2013) bahwa ikan mas transgenik *grass carp growth hormone (afgh)* tidak berpotensi mendominasi populasi alami ikan mas di alam setelah pengujian terbatas dilakukan. Hal ini dapat terjadi akibat adanya penurunan kemampuan berenang pada ikan mas transgenik GH (Liang *et al.* 2007). Dengan demikian terdapat perbedaan karakter antar ikan transgenik, sehingga pengujian lebih lanjut terkait teori *Trojan* perlu dilakukan di lapangan terbatas. Selanjutnya, teknik pemijahan buatan, dan triploidisasi untuk menghasilkan ikan mas triploid steril telah berhasil dikembangkan. Budi daya benih ikan mas transgenik dan triploid pada sistem budi daya tertutup dapat dilakukan untuk minimalisasi potensi transmisi transgen ke populasi alami.

Simpulan

Ikan mas jantan transgenik GH generasi kedua memiliki volume semen dan kelangsungan hidup juvenil pada umur 30 hari yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan non-transgenik. Parameter penelitian lain menunjukkan hasil yang sama dengan ikan non-transgenik dan tergolong dalam kategori baik.

Daftar pustaka

- Aliniya M, Khara H, Noveiri SB, Dadras H. 2013. Influence of age of common carp (*Cyprinus carpio*) broodstock on reproductive traits and fertilization. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13: 19-25.
- Bartke A, Chandrashekar V, Steger RW. 1996. Effects of growth hormone on neuro-endocrine function. *Acta Neurobiol Exp.*, 56: 883-842.
- Berishvili G, D’Cotta H, Baroiller JF, Segner H, Reinecke M. 2006. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol*. 146: 204–210.
- Billard R. 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14: 187-98.
- Chandrashekar V, Bartke A, Coschigano KT, Kopchick JJ. 1999. Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology*, 140: 1082–1088.
- Cosson J, Linhart O, Mims S, Shelton W, Rodina M . 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*) spermatozoa. *Fish Biol*. 56: 1348-1367.
- Dadras H, Khara H, Baradaran N, Shahkar E. 2011. Effect of sperm pH and density on fertilization and hatching rates of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). *International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences 2011* Pataya, Thailand.
- Devlin RH, Donaldson EM. 1992. Containment of genetically altered fish with emphasis on salmonids. In: Hew CL, Fletcher GL, editors. *World Scientific*. 229–265.
- Elster J, Mann H. 1952. Weitere untersuchungen uber die physiologie der befruchtung und die zuordnung der gameten bei fischen. *Arch Hydrobiol Suppl*. 20:267-76. [Abstract in English]
- Faridah, N. 2012. Introduksi dan ekspresi gen hormon pertumbuhan pada ikan mas transgenik. *Tesis*. Ilmu Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Fitzpatrick JL, Akbarashandiz H, Sakhrani D, Biagi CA, Pitcher TE, Devlin RH. 2011. Cultured growth hormone transgenic salmon are reproductively out-competed by wild-reared salmon in semi-natural mating arenas. *Aquaculture*, 312: 185–191.
- Fu C, Li D, Hu W, Wang Y, Zhu Z. 2007. Growth and energy budget of F2 “all-fish” growth hormone gene transgenic common carp. *J Fish Biol*. 70: 347-361.
- Ginzburg AS. 1968. Fertilization of fishes and the problem of polyspermy. Moscow. New York: Academy of Science USSR; Translation: *NOOAA and National Science Foundation*. p. 354.
- Guest WC, Avault JW, Rousel JA. 1976. Spermatogeny study of chanel catfish *Ictalurus punctatus*. *Trans Am Fish Soc.*, 104: 463-468.

- Hew CL, Fletcher GL. 2001. The role of aquatic biotechnology in aquaculture. *Aquaculture*, 197: 194-204.
- Howard RD, Andrew De Woody J, Muir WM. 2004. Transgenic male mating advantage provides opportunity for Trojan gene effect in a fish. *Proc Natl Acad Sci.* 10: 2934-2938.
- Lee CG, Devlin RH, Farrell AP. 2003. Swimming performance, oxygen consumption and excess post-exercise oxygen consumption in adult transgenic and ocean-ranched coho salmon. *J Fish Biol.*, 62: 753-766.
- LeGac F, Loir M, LeBail PY, Ollitrault M. 1996. Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* 44: 23-35.
- Lian, H, Hu W, Huang R, Du F, Liao L, Zhu Z, Wang Y. 2013. Transgenic common carp do not have the ability to expand populations. *Plos One.* 8(6): 1-6.
- Liang LD, Zhang FC, Wei H, Shan Z, Ping WY, Yan ZZ. 2007. Rapid growth cost in "all-fish" growth hormone gene transgenic carp: reduced critical swimming speed. *Chinese Science Bulletin*, 52(11): 1501-1506.
- Ling F, Luo Q, Wang JG, Wang YP, Wang WB, Gong XN. 2009. Effects of the "all-fish" GH (growth hormone) transgene expression on resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* infections in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 292: 1-5.
- Muir WM, Howard RD. 1999. Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proc Natl Acad Sci.*, 96: 13853-13856.
- Musselius VA. 1951. How to store carp milt and to determine its quality. *Rybnoe Khozyaistov*, 27: 51-3.
- Nader MR, Miura T, Ando N, Miura C, Yamauchi K. 1999. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol Reprod.* 61: 944-947.
- Pandian TJ, Marian LA. 1994. Problems and prospect of transgenic fish production. *Current Science*, 66(9): 635-649.
- Sundstrom LF, Lohmus M, Johansson J, Devlin RH. 2004. Growth hormone transgenic salmon pay for growth potential with increased predation mortality. *Proc R Soc Lond B*, 271: 350-352.
- Suzuki R. 1959. Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes: III. Non species specificity of stimulating factor. *Annot Zool Jap.* 32:105-11.
- Takashima Y. 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen Comp Endocrinol.* 152: 353-358.
- Vinas J, Piferrer F. 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biol Reprod.* 79: 738-747.

Kurdianto *et al.*

Zhang P, Hayat M, Joyce C, Gonzales LI, Lin CM, Dunham RA, Chen TT, Power DA. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the carp, *Cyprinus carpio* L. *Mol Reprod Develop.* 25: 3-13.

Zhu Z, Xu K, Xie Y, Li G, He L. 1989. A model of transgenic fish. *Sci Sin.* 2: 147-15.