

ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN ANALISIS EKSPRESI GEN PENGKODE *GROWTH HORMONE* PADA IKAN SIDAT (*Anguilla bicolor*)

Hamdan Syakuri[#], Satrio Haryu Wibowo, Anandita Ekasanti, Petrus Hary Tjahja Soedibya, Sri Marnani, Emyliana Listiowati, Dewi Nugrayani, dan Purnama Sukardi

[#]Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman, Jalan Dr. Suparno, Karangwangkal, Purwokerto, Banyumas, Jawa Tengah

(Naskah diterima: 26 April 2024; Revisi final: 28 Mei 2024; Disetujui publikasi: 28 Mei 2024)

ABSTRAK

Gen hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) perlu dipelajari untuk mendukung domestikasi ikan sidat (*Anguilla bicolor*) di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen pengkode GH serta menganalisis ekspresinya pada sampel ikan sidat *A. bicolor*. Primer untuk amplifikasi gen GH ikan sidat *A. bicolor* didesain berdasarkan sekuen gen GH dari beberapa spesies ikan sidat lain yang tersedia di GenBank. Sampel cDNA hipofisa dan otak ikan sidat digunakan untuk amplifikasi gen GH. Hasil amplifikasi disekuensing dan hasilnya dianalisis menggunakan analisis BLAST, *multiple sequences alignment*, *hormon signature*, dan filogenetik. Analisis ekspresi gen GH dilakukan menggunakan teknik *realtime* PCR dengan metode delta-delta CT pada 14 sampel ikan sidat ($23,1 \pm 19,6$ g; $24,5 \pm 4,2$ cm). Fragmen DNA sepanjang 486 bp berhasil diamplifikasi dan disekuensing. Sekuen gen GH *A. bicolor* memiliki similaritas nukleotida sebesar 98,49-99,14% jika dibandingkan dengan gen GH ikan sidat *A. anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica*. Sekuen parsial tersebut secara *in silico* diketahui mengkode bagian dari protein GH sepanjang 155 asam amino (aa). Sekuen asam amino protein GH *A. bicolor* sangat mirip dengan sekuen spesies ikan sidat lain dengan hanya tiga perbedaan asam amino dan membentuk satu percabangan pada pohon filogenetik. Tingkat ekspresi gen GH pada sampel ikan sidat memiliki variasi yang tinggi. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk studi selanjutnya khususnya berkaitan dengan peran gen GH dalam pertumbuhan ikan sidat *A. bicolor*.

KATA KUNCI: *Anguilla bicolor*; ekspresi gen; hormon pertumbuhan; RT-PCR; sekuen gen

ABSTRACT: *Isolation, Identification, and Analysis of Growth Hormone Coding Genes Expression in Eel (Anguilla bicolor)*

The growth hormone (GH) gene needs to be studied to support the domestication of the *Anguilla bicolor* eel in Indonesia. This study aimed to isolate and identify the GH coding gene and analyze its expression in samples of the eel *A. bicolor*. Primers for amplification of the GH gene of *A. bicolor* eels were designed based on GH gene sequences from several other eel species available in GenBank. Pituitary and brain cDNA samples of eel were used for GH gene amplification. The amplification results were sequenced and the results were analyzed using BLAST analysis, *multiple sequence alignment*, *hormone signature*, and *phylogenetic analysis*.

[#]Korespondensi: Program Studi Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Banyumas, Jawa Tengah
Email: hamdan.syakuri@unsoed.ac.id

The GH gene expression analysis was carried out using the real-time PCR technique with the delta-delta CT method on 14 eel samples (23.1 ± 19.6 g; 24.5 ± 4.2 cm). The 486 bp DNA fragment was successfully amplified and sequenced. The GH gene sequence of *A. bicolor* has a nucleotide similarity of 98.49-99.14% when compared with the GH gene of other eel species *A. anguilla*, *A. australis*, and *A. japonica*. This partial sequence was found in silico to code 155 amino acids (aa) GH protein. The amino acid sequence of the *A. bicolor* GH protein is very similar to that of other eel species with only three amino acid differences and forms one branch on the phylogenetic tree. The expression level of the GH gene in eel samples had high variations. The results of this study could be a basis for further studies, especially regarding the role of the GH gene in the growth of the eel *A. bicolor*.

KEYWORDS: *Anguilla bicolor*; expression of gene, growth hormone; RT-PCR; sequence of gene

PENDAHULUAN

Ikan sidat (*Anguilla bicolor*) merupakan ikan yang sedang dalam proses domestikasi menjadi komoditas perikanan budidaya di Indonesia. Jenis ikan sidat ini banyak ditemukan di perairan selatan Jawa, Sumatera, dan Sulawesi (Fahmi, 2015; Fahmi & Hirnawati, 2010). Tahap budidaya ikan sidat yang sudah dapat dilakukan adalah tahap pendederan dan pembesaran. Tahap ini menggunakan benih ikan sidat yang berasal dari alam, sehingga budidaya ikan sidat sangat tergantung pada keberhasilan usaha penangkapan dan ketersediaannya di alam (Setijanto *et al.*, 2014). Tahap domestikasi ini berada pada level 2, di mana baru sebagian dari siklus hidup ikan yang dapat dilakukan dalam lingkungan terkontrol (Teletchea, 2021; Teletchea & Fontaine, 2014). Untuk mendukung keberhasilan domestikasi ikan sidat, beberapa aspek telah dipelajari antara lain adalah biologi reproduksi (Rachmawati *et al.*, 2017), infeksi parasit (Pratama *et al.*, 2019), teknik budidaya (Affandi *et al.*, 2013; Marlina & Handayani, 2022; Yolla *et al.*, 2020), dan pakan (Arief *et al.*, 2011). Kajian tersebut umumnya bertujuan untuk mempelajari perkembangan gonad, infeksi penyakit, dan pertumbuhan ikan sidat di lingkungan terkontrol. Berkaitan dengan pertumbuhan, aspek yang perlu dikaji adalah gen pengkode hormon pertumbuhan.

Hormon pertumbuhan atau *growth hormone* (GH) memiliki peran penting dalam pertumbuhan hewan termasuk ikan, terutama melalui poros GH-*insulin-like growth factor-1*

(IGF-1) (Ndandala *et al.*, 2022). Hormon yang diproduksi dalam kelenjar *pituitary* (hipofisa) ini saat melekat pada *growth hormone receptor* (GHR) pada sel target yang akan memicu produksi dan sekresi IGF-1 (Dehkhoda *et al.*, 2018). *Growth hormone* memiliki peran penting dalam pembentukan tulang dan otot, metabolisme, dan pembentukan serta perbaikan jaringan tubuh (Dehkhoda *et al.*, 2018; Rotwein, 2020). Pada ikan, fungsi GH di antaranya adalah berkaitan dengan metabolisme, sistem imun, osmoregulasi, reproduksi, neuroendokrin dan neural, serta tingkah laku (Jönsson & Björnsson, 2002). Pada beberapa ikan teleostei, GH telah terbukti berkaitan dengan peningkatan laju pertumbuhan spesifik untuk panjang dan berat tubuh. Peningkatan laju pertumbuhan tersebut disebabkan karena peningkatan nafsu makan dan efisiensi konversi pakan (Jönsson & Björnsson, 2002).

Kajian tentang gen GH pada ikan sidat masih sangat jarang dan umumnya terbatas pada ikan sidat Jepang *Anguilla japonica*, ikan sidat Eropa *Anguilla anguilla*, dan ikan sidat Australia *Anguilla australis* (Nguyen *et al.*, 2022; Yamaguchi *et al.*, 1987). Karakteristik molekuler protein GH telah dideskripsikan dari *A. japonica* (Yamaguchi *et al.*, 1987). Ekspresi gen hormon pertumbuhan pada ikan sidat tersebut telah diamati pada saat perkembangan larva dan ekspresinya terdeteksi mulai 6 hari setelah menetas (Ozaki *et al.*, 2006). Selain itu tingkat ekspresi gen GH juga telah dipelajari pada perkembangan larva ikan sidat Eropa dan dilaporkan berkaitan dengan temperatur

pemeliharaan (Politis *et al.*, 2017). Sampai saat ini studi tentang gen GH pada *A. bicolor* masih sebatas pada analisis ekspresinya terkait pemberian kromium pikolat melalui pakan (Nugrayani *et al.*, 2023). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen pengkode GH serta menganalisis ekspresinya pada ikan sidat *A. bicolor*.

BAHAN DAN METODE

Desain Primer Gen *Growth Hormone* Ikan Sidat

Primer gen GH ikan sidat *A. bicolor* dirancang berdasarkan sekuen gen GH ikan sidat yang terdapat di GenBank, yaitu dari *A. japonica* (M24066, AY616666), *A. anguilla* (AY148493), dan *A. australis* (HQ436341). Pensejajaran sekuen dilakukan menggunakan Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) untuk memperoleh daerah yang lestari (*conserve*). Primer dirancang di daerah lestari tersebut dengan menggunakan perangkat lunak Primer 3 versi 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Karakteristik primer tersebut diuji untuk mengetahui peluang terbentuknya struktur melingkar (*hairpin*), *self-dimer*, dan *hetero-dimer* menggunakan perangkat lunak OligoAnalyzer versi 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). Prosedur ini menghasilkan tiga primer, yaitu ghAF1: 5` GGTCTTACTGGTCAGCTTCT 3`, ghAF2: 5` GCTTTCTCAAACAGCCTGAT 3`, dan ghAR: 5` GCATCGTTCCTAAGGTGTAC 3`. Kombinasi primer ghAF1 dan ghAR memiliki target sekitar 486 bp dan kombinasi primer ghAF2 dan ghAR memiliki target sekitar 173 bp.

Sampel untuk Identifikasi Gen *Growth Hormone*

Sampel ikan sidat stadia elver (sekitar 15 g) diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di wilayah Cilacap dan dibawa dalam kondisi hidup ke Laboratorium Riset, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman.

Sampel hipofisa dan otak kemudian diambil dari ikan sidat dengan prosedur sebagai berikut: 1) ikan sidat dimatikan dengan memotong kepala; 2) bagian kepala ikan sidat dibedah secara horizontal, 3) otak dan hipofisa diambil dan dimasukkan ke *microtube* 1,5 mL berisi 500 μ L RNA Later (Ambion), dan 4) sampel didiamkan pada temperatur ruang selama 30 menit, selanjutnya diinkubasi dalam *refrigerator* (4°C) selama 24 jam setelah itu disimpan dalam *freezer* (-20°C) sampai dilakukan isolasi RNA. Prosedur preservasi sampel menggunakan RNA later ini mengikuti protokol yang menyertai produk (Ambion).

Sampel untuk Analisis Ekspresi *Growth Hormone*

Sebanyak 14 ikan sidat stadia elver (23,1 \pm 19,6 g; 24,5 \pm 4,2 cm) diambil dari hasil pemeliharaan selama dua bulan dalam sebuah kolam terpal sirkuler dengan diameter 2 m. Kolam berisi air dengan ketinggian 40 cm dan dilengkapi dengan *aerator*. Ikan sidat yang dipelihara tersebut diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di Kabupaten Cilacap. Ikan sidat diberi pakan berupa pakan pasta dengan kandungan protein 40% pada pagi dan sore hari sebanyak 3% bobot tubuh per hari. Di akhir pemeliharaan, setiap individu ikan sidat diukur panjangnya, ditimbang beratnya, dimatikan, dan dibedah bagian kepalanya. Sampel hipofisa dari setiap ikan sidat diambil dan dipreservasi menggunakan RNA later sesuai dengan prosedur yang ada (Ambion).

Isolasi RNA

Sampel otak (sekitar 6 mg) dan total hipofisa ikan sidat diambil dari RNA later dengan menggunakan pinset kemudian dimasukkan ke *microtube* volume 1,5 mL. Sampel total RNA diisolasi menggunakan *Pure Link RNA Mini-Kit* sesuai dengan petunjuk pemakaiannya (Ambion). Sampel dimasukkan dalam 600 μ L *lysis buffer* yang telah ditambahkan 6 μ L β -Mercaptoethanol pada *microtube* volume 1,5 mL lalu sampel dihancurkan dengan *micropestle* dan disentrifugasi selama 15 detik dengan

kecepatan 12.000 rpm. Supernatan sebanyak 500 μ L dimasukkan dalam *microtube* volume 1,5 mL, lalu ditambahkan 500 μ L *ethanol* 70%, kemudian dihomogenkan. Sampel sebanyak 500 μ L dipindahkan ke dalam *spin cartridges* (tahap tersebut diulangi sampai semua larutan dimasukkan pada *spin cartridges*) kemudian disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Larutan pada tabung penampungan dibuang dan ditambahkan 600 μ L *wash buffer I* kemudian disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, *collective tube* diganti dan ditambahkan *wash buffer II* sebanyak 500 μ L lalu disentrifugasi kembali selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm (diulang sebanyak satu kali). Larutan yang berada pada *collection tube* dibuang, lalu sentrifugasi kembali. *Spin cartridges* diletakkan pada *recovery tube* dan ditambahkan *RNase-Free Water* sebanyak 30 μ L lalu diinkubasi 1 menit kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Sampel RNA kemudian disimpan pada suhu -80°C hingga proses berikutnya.

DNase Treatment dan Sintesis cDNA

Kontaminasi DNA pada sampel RNA dihilangkan menggunakan *DNase I-RNase Free* sesuai petunjuk pemakaiannya (Thermo Scientific). Sebanyak 10 μ L *mix DNase treatment* yang terdiri atas: 2 μ L RNA; 1 μ L 10x *reaction buffer with MgCl₂*; 2 μ L *DNase I-RNase Free*; 5 μ L *nuclease-free water* dalam tabung PCR 0,2 mL diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C. Inaktivasi DNase dilakukan dengan menambahkan 1 μ L 50 mM EDTA dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Sampel RNA untuk isolasi dan identifikasi gen digunakan sebagai *template* sintesis cDNA, sedangkan sampel RNA untuk analisis ekspresi digunakan sebagai *template* dalam *one step realtime RT-PCR*.

Sampel RNA setelah tahap *DNase treatment* digunakan untuk menyintesis cDNA menggunakan *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Sebanyak 4 μ L 5x *Reaction Buffer*, 1 μ L *RiboLock RNase*

Inhibitor, 2 μ L 10 mM dNTP mix, 1 μ L *RevertAid* dimasukkan dalam *tube* PCR, lalu ditambahkan 2 μ L sampel RNA produk *DNase treatment*, 1 μ L *random hexamer primer*, 9 μ L *nuclease-free water*, kemudian dihomogenisasi dengan *vortex* dan *spin down*. Sampel diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan suhu 40°C selama 60 menit, dan diakhiri pada 70°C selama 5 menit kemudian sampel disimpan dalam *freezer* (-20°C).

Amplifikasi Gen *Growth Hormone* dengan Teknik RT-PCR

Amplifikasi gen GH dilakukan dengan *Mytaq Hot Start Red PCR Master Mix* (2x) sesuai protokol (Bioline) dengan pasangan primer ghAF1 dan ghAR atau pasangan primer ghAF2 dan ghAR. Sebagai kontrol, amplifikasi juga dilakukan pada gen pengkode beta-aktin dengan primer BA-F1 (5' TGACGGACAGGTCATCACC 3') dan BA-R1 (5' CTCATCGTACTCCTGCTTGC 3') dengan target panjang produk 364 bp.

Amplifikasi dilakukan dengan total volume 50 μ L yang terdiri atas *PCR Master Mix* (2x) sebanyak 25 μ L: *forward primer* 1 μ L (10 pmol/ μ L); *reverse primer* 1 μ L (10 pmol/ μ L); *nuclease-free water* 21 μ L; dan *template* (cDNA) 2 μ L. Homogenisasi dilakukan dengan *vortexing* dan *spinning down*. Setelah itu, larutan dimasukkan pada mesin PCR (Primus 25 Thermocycler, Peqlab). Siklus temperatur yang digunakan adalah suhu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus: denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 30 detik, dan *extension* tambahan 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis Produk Amplifikasi

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel *agarose* 2% yang diberi *SYBR safe DNA gel stain* (Invitrogen) dalam buffer TBE 1X. Sampel hasil amplifikasi dan *DNA Ladder* dimasukkan pada sumuran dalam *agarose gel* menggunakan *micropipette* sebanyak 5 μ L. Alat elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt dalam waktu sekitar 30 menit atau sampel mencapai

2/3 dari *agarose gel*. Hasil *elektroforesis* dilihat menggunakan *UV-transilluminator* dan diambil gambarnya.

Analisis sekuen Gen GH

Sampel hasil PCR beserta primer ghAF1 dan ghAR dikirim ke PT. Genetika Sains Indonesia untuk dilakukan sekuensing dengan *ABI dye terminator chemistry* di First BASE Laboratories SDN BHD. Hasil dari sekuensing dievaluasi dan disatukan untuk memperoleh sekuen konsensus dengan menggunakan aplikasi *BioEdit* (Hall, 1999). Selanjutnya sekuen gen GH ikan sidat dianalisis menggunakan analisis BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Sekuen gen GH diterjemahkan secara *in silico* ke dalam sekuen asam amino menggunakan <https://web.expasy.org/translate/> (Gasteiger *et al.*, 2003). Identifikasi *hormone signature* dilakukan menggunakan *database prosite* pada <https://prosite.expasy.org> (Hulo *et al.*, 2006). Hasil yang diperoleh kemudian digunakan dalam analisis *Multiple Sequences Alignment* dengan Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), dan analisis filogenetik menggunakan <https://www.phylogeny.fr/> (Dereeper *et al.*, 2008).

Analisis Ekspresi GH dengan One Step Realtime RT-PCR

Tingkat ekspresi gen GH pada hipofisa diukur dengan metode delta-delta Ct dengan gen beta- aktin sebagai acuan internal menggunakan *one step realtime RT-PCR* dengan alat *Line-gene K Real-time PCR Detection System* (Bioer Technology). Bahan yang digunakan adalah *superscript platinum one step realtime PCR kit* (Invitrogen). Prosedur PCR dilakukan dengan mengikuti petunjuk penggunaan. *Master Mix* (2x) sebanyak 5 μL ; *forward primer* 0,2 μL (10 pmol/ μL); *reverse primer* 0,2 μL (10 pmol/ μL); *nuclease-free water* 4,2 μL ; dan *template* (RNA) 0,4 μL dicampurkan dalam tabung PCR 0,2 mL sehingga diperoleh larutan sebanyak 10 μL . Homogenisasi dilakukan dengan *vortexing* dan *spinning down*. Setelah itu, larutan dimasukkan pada mesin *realtime PCR* dengan pengaturan

program: suhu sintesis cDNA 45°C selama 10 menit, denaturasi awal 95°C selama 2 menit, dan diikuti 40 siklus yang terdiri atas denaturasi 95°C selama 10 detik, *annealing* 54 °C selama 15 detik, dan *extension* 72°C selama 15 detik. Pembacaan sinyal fluorosens dilakukan di setiap siklus pada akhir tahap *extension*. Analisis kurva *melting* dilakukan dari suhu 55-95°C. Selain itu, gen beta-aktin sebagai kontrol diamplifikasi dengan perlakuan yang sama seperti amplifikasi gen GH. Primer untuk gen GH adalah ghAF1 (5` GCTTTCTCAAACAGCCTGAT 3`) dan ghAR (5` GCATCGTTCCTAAGGTGTAC 3`) dengan panjang produk 173 bp. Primer untuk gen beta-aktin adalah BA-F1 (5` TGACGGACAGGTCATCACC 3`) dan BA-R1 (5` CTCATCGTACTCCTGCTTGC 3`) dengan panjang produk 364 bp. Dengan sampel yang memiliki delta Ct ($Ct_{gh} - Ct_{actin}$) terendah sebagai kalibrator, tingkat ekspresi gen GH (R_{gh}) dihitung menggunakan modifikasi rumus delta-delta Ct yang umum digunakan (Forlenza *et al.*, 2012):

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{gh} - Ct_{actin})_{\text{sampel}} - (Ct_{gh} - Ct_{actin})_{\text{kalibrator}}$$

$$R_{gh} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Analisis Data

Data yang dihasilkan dari penelitian ini yaitu gambar visualisasi hasil PCR, sekuen gen hormon pertumbuhan, hasil analisis BLAST, hasil penerjemahan (deduksi asam amino) gen GH, hasil analisis *multiple sequences alignment*, dan hasil analisis filogenetik. Data tersebut dianalisis secara deskriptif kualitatif. Data ekspresi gen GH pada ikan sidat disajikan dalam grafik *box plot*.

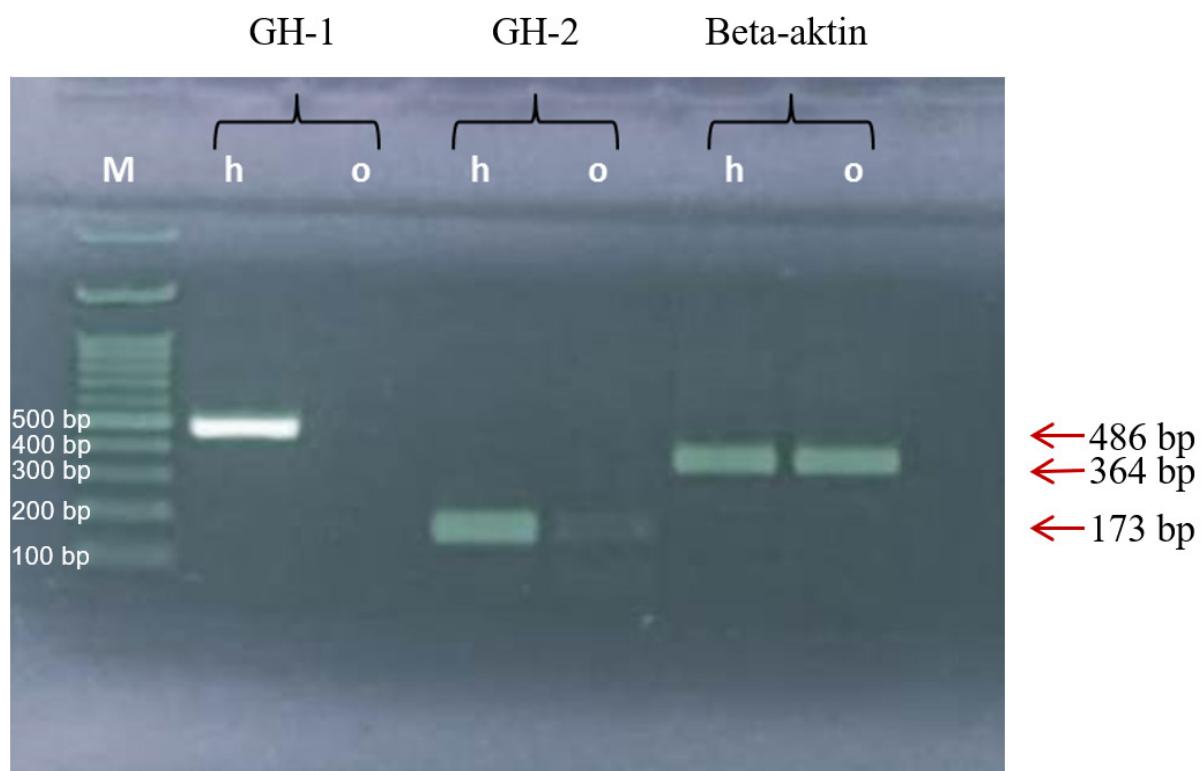
HASIL DAN BAHASAN

Informasi mengenai GH menjadi salah satu aspek penting dalam domestikasi ikan sidat *A. bicolor*. Domestikasi komoditas ini ada pada tahap kedua di mana ikan sidat pada stadia *glass eel* dan elver hasil tangkapan sudah dapat diadaptasikan pada lingkungan terkontrol

untuk tahap pembesaran (Teletchea, 2021; Teletchea & Fontaine, 2014). Dalam tahap ini, upaya meningkatkan laju pertumbuhan menjadi salah satu tujuan utama. Hasil identifikasi gen GH pada ikan sidat *A. bicolor* dari penelitian ini sangat berguna dalam upaya meningkatkan pertumbuhan ikan sidat. Selain itu hasil penelitian ini juga dapat digunakan untuk mempelajari aspek lain seperti reproduksi dan daya tahan tubuh ikan sidat. Hal ini karena GH merupakan hormon yang berkaitan dengan banyak aspek biologi hewan (Daza & Larhammar, 2018; Jönsson & Bjönsson, 2002).

Dalam penelitian ini, gen pengkode GH

ikan sidat *A. bicolor* berhasil diamplifikasi menggunakan primer yang telah didesain berdasarkan sekuen gen GH *A. japonica*, *A. anguilla*, dan *A. australis* (Gambar 1). Fragmen GH-1 hanya teramplifikasi dari cDNA yang disintesis menggunakan sampel RNA dari hipofisa sebagai *template*. Selain dari sampel RNA hipofisa, fragmen GH-2 juga ditemukan pada sampel RNA otak dengan konsentrasi produk PCR yang jauh lebih sedikit. Namun hal ini kemungkinan terjadi karena adanya kontaminan DNA yang masih tersisa setelah tahapan *DNase treatment*. Hasil penelitian selama ini menunjukkan ekspresi gen hormon pertumbuhan hanya ditemukan pada hipofisa



Gambar 1. Hasil RT-PCR gen hormon pertumbuhan (GH) dan beta-aktin dari sampel RNA hipofisa (h) dan otak (o) ikan sidat *Anguilla bicolor*. Lane M adalah marker 100 bp DNA. GH-1 diamplifikasi menggunakan sepasang primer (ghAF1-ghAR) dengan DNA target 486 bp dan GH-2 diamplifikasi menggunakan sepasang primer (ghAF2-ghAR) dengan DNA target 173 bp. Panjang produk amplifikasi untuk beta-aktin adalah 364 bp

Figure 1. RT-PCR results of growth hormone (GH) and beta-actin genes from the pituitary (h) and the brain (o) RNA samples of *Anguilla bicolor* eel. Lane M is a 100 bp DNA marker. GH-1 was amplified using a pair of primers (ghAF1-ghAR) with a target DNA of 486 bp and GH-2 was amplified using a pair of primers (ghAF2-ghAR) with a target DNA of 173 bp. The amplification product length for beta-actin is 364 bp

dan tidak ditemukan pada jaringan tubuh lain seperti otak (Dehkhoda *et al.*, 2018; Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Keberhasilan amplifikasi gen beta-aktin menunjukkan bahwa tidak ada masalah teknis dalam RT-PCR.

Hasil analisis BLAST menunjukkan sekuen tersebut memiliki similaritas sebesar 98,49-99,14% jika dibandingkan dengan sekuen gen GH *A. Anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica* (Tabel 1). Sekuen gen yang diperoleh juga dapat secara sempurna diterjemahkan ke dalam sekuen protein sepanjang 155 aa (Gambar 2). Hasil analisis BLAST dan hasil penerjemahan ini menunjukkan bahwa sekuen yang diperoleh terkonfirmasi sebagai sekuen gen GH *A. bicolor*.

Hasil analisis *multiple sequences alignment*

menunjukkan ada tiga perbedaan residu asam amino GH dari empat spesies ikan sidat yang dibandingkan (Gambar 3). Pada perbedaan pertama, protein GH *A. bicolor* memiliki asam amino yang sama dengan protein GH *A. australis* dan *A. anguilla* yaitu asam amino lisin dan berbeda dibandingkan protein GH *A. japonica* (leusin). Perbedaan kedua menunjukkan protein GH *A. bicolor* memiliki asam amino leusin, sedangkan protein GH tiga spesies lainnya memiliki asam amino valin. Perbedaan ketiga menunjukkan protein GH *A. bicolor* dalam penelitian ini memiliki asam amino yang sama dengan protein GH *A. australis* dan *A. anguilla* (lisin), yang berbeda dibandingkan asam amino protein GH *A. japonica* (asparagin).

```
tgtcagcttctctgtgaacgcggtggagcccatttcctctacaacctcttcaccagcgcc
V S F S V N A V E P I S L Y N L F T S A
gttaaccgagcacagcacctgcacacactggctgccgaaatatacaaggaatttgagcga
V N R A Q H L H T L A A E I Y K E F E R
agcatcccacccgagggccacagacagctcagcaagacctccccattggccggtgttac
S I P P E A H R Q L S K T S P L A G C Y
tccgactccatccctacccccacaggcaaagatgaaacgcaggagaaatcggatgggtac
S D S I P T P T G K D E T Q E K S D G Y
ttgctgcgcatctcctcagccctgatccagtcatgggtgtatcctctgaagacctgagc
L L R I S S A L I Q S W V Y P L K T L S
gatgctttctcaaacagcctgatgtttgggacctctgatgggatctttgataagctggag
D A F S N S L M F G T S D G I F D K L E
gacctgaacaaggcatcaatgaattaatgaaggttttaggtgacggtggcatttacatt
D L N K G I N E L M K V L G D G G I Y I
gaggatgtgagaaagctccggtacgagaacttcgacgtacaccttag
E D V R K L R Y E N F D V H L
```

Gambar 2. Sekuen nukleotida dan deduksi asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat, *Anguilla bicolor*

Figure 2. Nucleotide sequences and amino acid deduction of the growth hormone of *Anguilla bicolor*

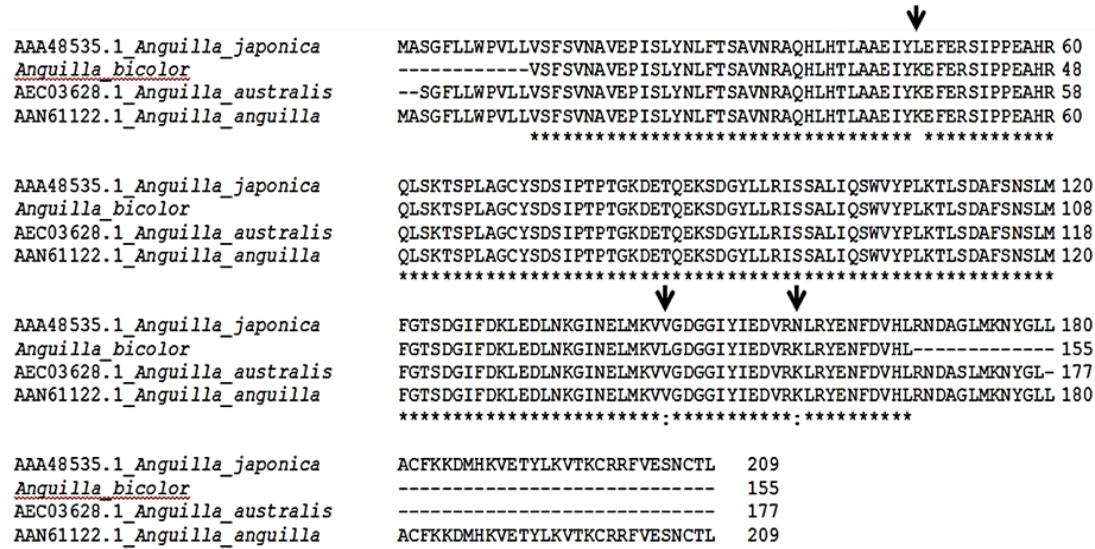
Tabel 1. Similaritas sekuen nukleotida gen pengkode hormon pertumbuhan ikan sidat *Anguilla bicolor* dibandingkan gen yang sama dari jenis ikan sidat lain

Table 1. Similarity of the nucleotide sequence of the gene encoding growth hormone of the eel *Anguilla bicolor* compared to the same gene from other eel species

Spesies ikan sidat <i>Eel species</i>	Nomor akses <i>Accession number</i>	Similaritas (%) <i>Similarity (%)</i>
<i>Anguilla australis</i>	HQ436341.1	99,14
<i>Anguilla anguilla</i>	AY148493.1	99,14
<i>Anguilla japonica</i>	M24066.1	98,49

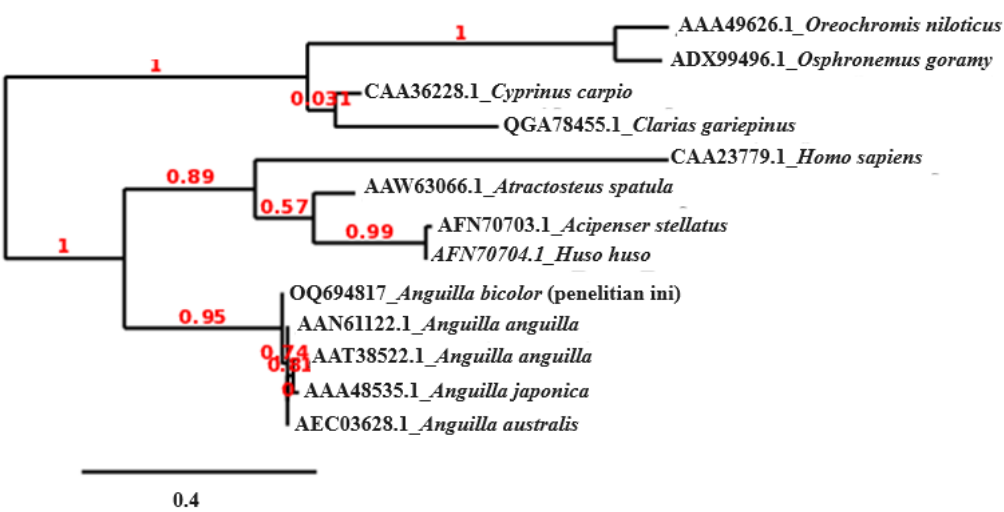
Gambar 4 menunjukkan hasil analisis filogenetik sekuen asam amino protein GH beberapa spesies ikan dan manusia. Berdasarkan sekuen asam amino GH, semua jenis ikan sidat termasuk *A. bicolor* membentuk satu percabangan yang berbeda dibandingkan jenis ikan lain. Percabangan kelompok

ikan sidat lebih dekat dengan percabangan kelompok ikan seperti *Acipenser stellatus* dan *Atractosteus spatula* dan terpisah lebih jauh dengan percabangan kelompok ikan air tawar yang umum dibudidayakan di Indonesia, yaitu *Oreochromis niloticus*, *Osphronemus goramy*, *Cyprinus carpio*, dan *Clarias gariepinus*.



Gambar 3. Multiple sequences alignment sekuen asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat *Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor*, *Anguilla australis*, dan *Anguilla anguilla*. Tanda panah menunjukkan posisi asam amino yang berbeda

Figure 3. Multiple sequences alignment of amino acid sequences of growth hormone eels *Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor*, *Anguilla australis*, and *Anguilla anguilla*. The arrows indicate the positions of the different amino acids



Gambar 4. Filogenetik sekuen asam amino hormon pertumbuhan beberapa jenis ikan sidat dan ikan lainnya

Figure 4. Phylogenetic of growth hormone amino acid sequences of several species of eels and other fish

Analisis *multiple sequences alignment* dalam penelitian ini digunakan untuk membandingkan sekuen asam amino GH dari 13 spesies ikan, termasuk GH *A. bicolor* yang diperoleh dalam penelitian ini. Seperti halnya hasil analisis filogenetik, hasil analisis *multiple sequences alignment* juga menunjukkan bahwa GH memiliki variasi yang sangat tinggi berdasarkan urutan

asam amino (Gambar 5). Dari sekuen asam amino yang secara sempurna tersejajarkan, sekuen GH yang dibandingkan hanya memiliki 24 asam amino yang sama. Selain itu, Gambar 5 juga menunjukkan bahwa GH dari semua spesies yang diuji memiliki dua penanda dengan letak dan panjang yang konsisten antarspesies. Penanda pertama sepanjang 34

CAA23779.1 Homo sapiens	MATGSRSTLLAFLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRFLDNASLRAHRLHQLADITYQETEEA	60
Anguilla bicolor	-----VS--FS-----VXAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLLTLAAEIKYKEERS	41
AAT38522.1 Anguilla anguilla	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLLTLAAEIKYKEERS	53
AAA48535.1 Anguilla japonica	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLLTLAAEIKYKEERS	53
AEC03628.1 Anguilla australis	--SGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLLTLAAEIKYKEERS	51
AAN61122.1 Anguilla anguilla	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLLTLAAEIKYKEERS	53
AAW63066.1 Atractosteus spatula	-----AQLHQLADITYKDEFT	18
AFN70703.1 Acipenser stellatus	-----PKESGAYPMIPLSSSLFTNAVLRAQYLHQLADITYKDEFT	40
AFN70704.1 Huso huso	-----CPVLLVLI--LLVSPKESGAYPMIPLSSSLFTNAVLRAQYLHQLADITYKDEFT	51
AAA49626.1 Oreochromis niloticus	MNSVV-----LLLSVVC-----LGVSSQITDSQRLFSIAVNRVTHLLLAQRLFSDEESS	51
ADX99496.1 Osphronemus goramy	MDKVV-----FLLSVLS-----VGVSSQITDSQRLFSIAVSRVQHLLLAQRLFSDEESS	51
CAA36228.1 Cyprinus carpio	MARVL-----VLLSVVL--VS--LLVNOGRASDNQRLFNNAVIRVQHLLLAQRLFSDEESS	53
QGA78455.1 Clarias gariepinus	MARVL-----VLLSVVVGES--VFYQGATFETQRLFNNAVIRVQHLLLAQRLFSDEESS	54
	. ** *	;
CAA23779.1 Homo sapiens	YIPKEQKYSFLQNPOTSLTSESPTSNRETTOKENLELRISLLIQSNLEEVQFLR	120
Anguilla bicolor	IPPEAHRQLSK-TSPLAGCYDSPTTGKDTQEKSDGYLRISANIQSNVYFLKTL	100
AAT38522.1 Anguilla anguilla	IPPEAHRQLSK-TSPLAGCYDSPTTGKDTQEKSDGYLRISANIQSNVYFLKTL	112
AAA48535.1 Anguilla japonica	IPPEAHRQLSK-TSPLAGCYDSPTTGKDTQEKSDGYLRISANIQSNVYFLKTL	112
AEC03628.1 Anguilla australis	IPPEAHRQLSK-TSPLAGCYDSPTTGKDTQEKSDGYLRISANIQSNVYFLKTL	110
AAN61122.1 Anguilla anguilla	IPPEAHRQLSK-TSPLAGCYDSPTTGKDTQEKSDGYLRISANIQSNVYFLKTL	112
AAW63066.1 Atractosteus spatula	YVPDEQRHSSK-SSPSAICYESIPANTGKDAQQRDVEQLPFLANIQSNISPLQSL	77
AFN70703.1 Acipenser stellatus	YDPDEQRHSSK-NSPSAICYETIPANTGKDAQQRDVEQLPFLANIQSNISPLQSL	99
AFN70704.1 Huso huso	YVPDEQRHSSK-NSPSAICYETIPANTGKDAQQRDVEQLPFLANIQSNISPLQSL	110
AAA49626.1 Oreochromis niloticus	LQTEEQRLNKL-IFLQDFNDYIISIDKHRTORSVLKLSISYGVNHEFFSRSL	110
ADX99496.1 Osphronemus goramy	LQTEEQRLNKL-IFLQDFNDYIISIDKHRTORSVLKLSISYRNIHEFFSRSL	110
CAA36228.1 Cyprinus carpio	LLPEERRQLSK-IFPLSFNDYIISIDKHRTORSVLKLSISYRNIHEFFSRSL	112
QGA78455.1 Clarias gariepinus	LLPEERRQLSK-IFPLSFNDYIISIDKHRTORSVLKLSISYRNIHEFFSRSL	111
	. : *	;
CAA23779.1 Homo sapiens	SVFANSLVYGASDSNVYDLKDEETQTMGRLEDGSPRTGQ---IFKQTYSKFDTN	177
Anguilla bicolor	DAFSNSLMFGTSD-GIFDKIEDNKGINELMKVLGDGGIYIED---VRKLYENFDVHL	155
AAT38522.1 Anguilla anguilla	DAFSNSLMFGTSD-GIFDKIEDNKGINELMKVVDGGIYIED---VRNRLY-----	160
AAA48535.1 Anguilla japonica	DAFSNSLMFGTSD-GIFDKIEDNKGINELMKVVDGGIYIED---VRNRLYENFDVHL	168
AEC03628.1 Anguilla australis	DAFSNSLMFGTSD-GIFDKIEDNKGINELMKVVDGGIYIED---VRKLYENFDVHL	166
AAN61122.1 Anguilla anguilla	DAFSNSLMFGTSD-GIFDKIEDNKGINELMKVVDGGIYIED---VRKLYENFDVHL	168
AAW63066.1 Atractosteus spatula	RVFNSLSLVFGTSD-RIFEKQDDEGIVTITREIDEGSPRIAA---FLTLTYEKFDTNL	133
AFN70703.1 Acipenser stellatus	RVFTNSLVFGTSD-RVFEKQDDEGIVTITREIDEGSPRIAA---LLKLTIDKFDVNL	154
AFN70704.1 Huso huso	RVFTNSLVFGTSD-RVFEKQDDEGIVTITREIDEGSPRIAA---LLKLTIDKFDVNL	166
AAA49626.1 Oreochromis niloticus	GGSS-----LRN-QISPRSEKTLILLIRANQDEAENYPTDTLQHPYGNYYQSLG	163
ADX99496.1 Osphronemus goramy	GGSA-----QRY-QISPKSELMRGLQLIKANQDAEMFSDGVVPLAPYGNYYQSLG	163
CAA36228.1 Cyprinus carpio	GTVNSLSLVGPNP-QLTEKADKMGISVLIQACLDGGQPNMDDNS-LPLPFEDFYLTMG	170
QGA78455.1 Clarias gariepinus	-----LGNPY-HISEKLAIKMETGVLEGGVDGQTSIDENHA-FAPPFEDFYLT	161
	: * * * *	:
CAA23779.1 Homo sapiens	NDDALLKNYGLLYTRKDMKHVETFLRIVQRSV-EGSCGF---	217
Anguilla bicolor	-----	155
AAT38522.1 Anguilla anguilla	-----	160
AAA48535.1 Anguilla japonica	NDAGLMKNYGLLAIRKDMKHVETYLKVTKRRFVESNCTL---	209
AEC03628.1 Anguilla australis	NDASLMKNYGL-----	177
AAN61122.1 Anguilla anguilla	NDAGLMKNYGLLAIRKDMKHVETYLKVTKRRFVESNCTL---	209
AAW63066.1 Atractosteus spatula	NDDVLMKNYGLLAIRKDMKHVETYLKVTKRRFVESNCTL---	150
AFN70703.1 Acipenser stellatus	-----	154
AFN70704.1 Huso huso	NDDALFKNYGLLSIRKDMKHVETYLK-----	193
AAA49626.1 Oreochromis niloticus	GNESLRQTYELLAIRKDMKHVETYLTVAKRLSPEANCTL---	204
ADX99496.1 Osphronemus goramy	DDESILRRSYELLAIRKDMKHVETYLTVAKRLSPEANCTL---	204
CAA36228.1 Cyprinus carpio	EN-NLRRESFRLLAIRKDMKHVETYLTVAKRRSLDSNCTL---	210
QGA78455.1 Clarias gariepinus	EG-NLRKSFRLLSIRKDMKHVETYLTVAKRRSLDSNCTLVEY	204

Gambar 5. *Multiple sequences alignment* sekuen asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat, beberapa spesies ikan lain, dan manusia. *Highlight* hijau dan tanda * menunjukkan jenis asam amino yang sama. Huruf merah menunjukkan somatotropin, prolactin and related hormones signature 1 (kelompok pertama) dan 2 (kelompok kedua)

Figure 5. *Multiple sequences alignment* of amino acid sequences of eel growth hormone, several other fish species, and humans. Green highlights and * mark indicate the same type of amino acid. Red letters indicate somatotropin, prolactin and related hormones signature 1 (first group) and 2 (second group)

asam amino dan penanda kedua sepanjang 18 asam amino. Secara khusus berdasarkan sekuen parsial GH *A. bicolor* (155 aa) yang diperoleh dalam penelitian ini, penanda pertama GH *A. bicolor* terletak pada asam amino nomor 58-95.

Fragmen gen GH ikan sidat *A. bicolor* yang berhasil teridentifikasi adalah bagian *coding region* sepanjang 465 bp yang mengkode 155 aa dan telah dideposit di GenBank dengan kode akses OQ694817. Sebagai pembanding dan sekaligus dasar pembuatan *primer* adalah sekuen lengkap *coding region* gen GH *A. anguilla* dan *A. japonica*. *Coding region* gen GH pada kedua ikan sidat tersebut memiliki panjang 627 bp yang mengkode 209 aa (Degani *et al.*, 2003). Fragmen yang diperoleh dalam penelitian ini diyakini sebagai bagian gen GH dengan dasar: 1) memiliki similaritas yang sangat tinggi yaitu sekitar 98,49-99,14% dibandingkan sekuen gen GH ikan sidat lainnya, 2) secara filogenetik menjadi bagian dalam cabang gen GH ikan sidat, 3) secara tepat dapat diterjemahkan menjadi urutan asam amino tanpa adanya *gap*, dan 4) sekuen asam amino yang diperoleh meliputi *hormon signature* pertama dari protein GH.

Gen GH *A. bicolor* belum dapat terisolasi secara lengkap dalam penelitian ini karena keterbatasan metode yang digunakan. Identifikasi gen dalam penelitian ini dilakukan dengan metode RT-PCR konvensional menggunakan tiga *primer* dengan dua kombinasi pasang *primer* yang didesain berdasarkan *coding region* gen GH jenis ikan sidat lain. Isolasi gen secara utuh umumnya dilakukan dengan metode *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) berdasarkan sekuen parsial yang sudah diketahui (Yeku & Frohman, 2011). Sebagai contoh, metode ini banyak digunakan untuk memperoleh sekuen utuh gen GH ikan seperti dari *Pangasianodon hypophthalmus* (Sekar *et al.*, 2014), *Arapaima gigas* (Lima *et al.*, 2023), dan *Epinephelus akaara* (Yuan *et al.*, 2020).

Hasil analisis *multiple sequences alignment* menunjukkan bahwa protein GH dari berbagai hewan memiliki urutan asam amino yang sangat beragam. Namun demikian protein GH memiliki sedikit residu asam amino yang sangat *conserve* khususnya asam amino

cysteine di daerah *hormone signature*. Residu *cysteine* ini memiliki peran penting dalam memfasilitasi ikatan antara GH dan GH *receptor* (Brooks, 2012). Hal ini kemungkinan yang menyebabkan penggunaan GH rekombinan dari suatu spesies hewan dapat meningkatkan pertumbuhan spesies hewan lain yang secara taksonomi jaraknya jauh. Sebagai contoh adalah pemberian rekombinan *bovine* GH yang mampu meningkatkan pertumbuhan *gilthead sea-bream Sparus aurata* (Blasco *et al.*, 2021), dan *coho salmon Oncorhynchus kisutch* (Muttray *et al.*, 2019). Lebih lanjut, *coho salmon* yang diberi *bovine* GH menunjukkan laju pertumbuhan yang sama dibandingkan ikan yang diberi GH rekombinan dari *sockeye salmon Oncorhynchus nerka*, yang secara taksonomi sangat dekat (Muttray *et al.*, 2019).

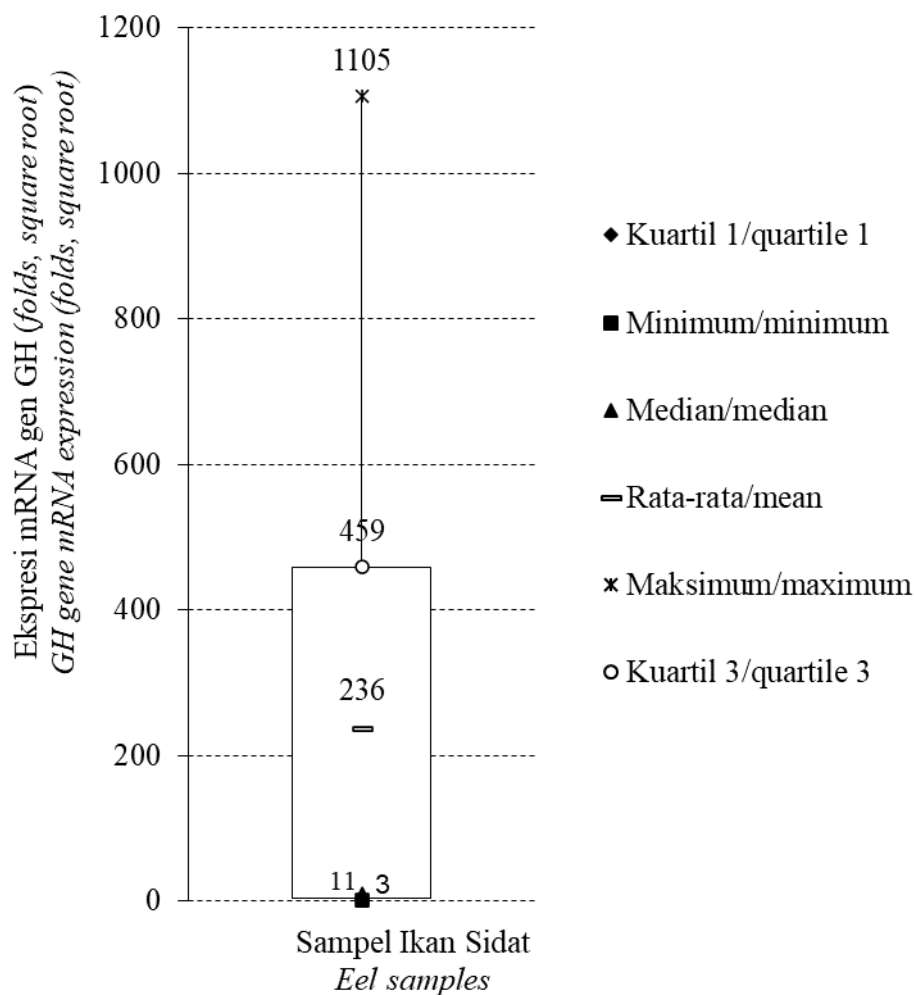
Pengaruh GH rekombinan yang tidak spesifik spesies membuka peluang penggunaannya untuk meningkatkan produktivitas akuakultur ikan sidat *A. bicolor*. Hasil penelitian menunjukkan pemberian GH rekombinan dari *A. japonica* dapat meningkatkan pertumbuhan larva ikan sidat tersebut (Sudo *et al.*, 2022). Sampai saat ini belum tersedia GH rekombinan dari *A. bicolor*. Salah satu GH rekombinan yang dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas budidaya ikan sidat adalah *bovine* GH. Hal ini karena *bovine* GH banyak tersedia di pasaran dan terbukti mampu meningkatkan pertumbuhan ikan (Muttray *et al.*, 2019). Selain itu upaya peningkatan pertumbuhan ikan sidat Indonesia juga dapat dilakukan menggunakan GH rekombinan dari jenis ikan budidaya yang sudah banyak diteliti di Indonesia seperti dari ikan mas *C. carpio* (Utomo *et al.*, 2011) dan ikan kerapu bebek *Cromileptes altivelis* (Faizal *et al.*, 2012). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian rGH yang dikombinasikan dengan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) dan *anti-dopamine* (AD) selain memacu perkembangan gonad juga meningkatkan pertumbuhan ikan sidat *A. bicolor* (Ahlina *et al.*, 2015).

Hasil analisis ekspresi gen dengan metode delta-delta CT menunjukkan tingkat ekspresi

mRNA GH yang sangat bervariasi. Tingkat ekspresi mRNA GH pada ikan sidat yang tertinggi memiliki nilai 1.105 kali dibandingkan tingkat ekspresi yang paling rendah (Gambar 6). Variasi ekspresi mRNA GH sidat *A. bicolor* yang tinggi juga diperoleh pada penelitian sebelumnya (Nugrayani *et al.*, 2023).

Keberhasilan isolasi gen GH dalam penelitian ini menjadi tahap penting dalam penelitian selanjutnya mengenai peran hormon ini pada ikan sidat *A. bicolor*. Hasil penelitian ini salah satunya dapat digunakan

untuk merancang *real time* RT-PCR untuk kajian ekspresi gen hormon pertumbuhan pada ikan sidat *A. bicolor*. Dalam penelitian ini, salah satu kombinasi *primer* telah berhasil digunakan untuk mengukur ekspresi gen GH menggunakan teknik *real time* RT-PCR dengan metode delta-delta Ct dengan gen beta-aktin sebagai acuan internal. Metode yang sama telah digunakan untuk mengevaluasi ekspresi gen GH *A. bicolor* yang diberi pakan mengandung kromium pikolinat (Nugrayani *et al.*, 2023). Metode delta-delta Ct termasuk



Gambar 6. Ekspresi mRNA gen GH ikan sidat *Anguilla bicolor*

Figure 6. mRNA expression of the GH gene of *Anguilla bicolor* eels samples

metode analisis ekspresi gen secara semi kuantitatif. Hasil penggunaan metode ini tidak menunjukkan secara langsung jumlah molekul mRNA GH yang diproduksi dalam hipofisa ikan sidat. Hasil metode ini dapat menunjukkan angka kelipatan banyaknya mRNA suatu sampel relatif terhadap mRNA beta-aktin dan relatif terhadap sampel yang digunakan sebagai kalibrator (Forlenza *et al.*, 2012). Sampel yang digunakan sebagai kalibrator dalam penelitian ini adalah sampel yang memiliki nilai delta Ct ($Ct_{GH} - Ct_{Actin}$) yang paling rendah.

Hasil analisis ekspresi gen GH menggunakan metode delta-delta Ct menunjukkan variasi yang tinggi. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan peran GH terhadap pertumbuhan somatik (Blasco *et al.*, 2021; Ndandala *et al.*, 2022; Rotwein, 2020; Sudo *et al.*, 2022). Perbedaan ekspresi gen GH pada ikan sidat *A. anguilla* juga ditemukan pada jenis kelamin yang berbeda, di mana ikan sidat betina memiliki ekspresi gen GH yang lebih tinggi dibandingkan ikan sidat jantan. Hal tersebut juga berkaitan dengan pertumbuhan ikan sidat betina yang lebih cepat dibandingkan pertumbuhan ikan sidat jantan (Degani *et al.*, 2003). Tingkat ekspresi GH pada individu betina yang lebih tinggi dibandingkan pada individu jantan juga ditemukan pada ikan lain, yaitu *Scatophagus argus* (Deng *et al.*, 2014).

Selanjutnya metode delta-delta Ct dengan primer yang dirancang dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mengkaji regulasi ekspresi GH pada ikan sidat *A. bicolor*. Regulasi ekspresi GH menjadi kajian yang penting untuk dilakukan dalam rangka meningkatkan produktivitas akuakultur ikan sidat *A. bicolor*. Kajian ekspresi gen GH ikan sidat *A. anguilla* dapat diarahkan untuk mempelajari perannya dalam beberapa aspek seperti pertumbuhan, daya tahan tubuh, dan reproduksi. Tiga aspek tersebut merupakan bagian dari aspek penting dalam domestikasi ikan (Teletchea, 2021; Teletchea & Fontaine, 2014) dan secara umum diketahui berkaitan erat dengan gen GH (Jönsson & Björnsson, 2002; Ndandala

et al., 2022). Ekspresi GH dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi, pemuasaan, dan kondisi lingkungan. Pemuasaan ikan dilaporkan meningkatkan ekspresi GH diiringi dengan penurunan IGF-I (Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Peningkatan kadar protein pada pakan meningkatkan ekspresi GH *Oncorhynchus mykiss* (Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Tingkat ekspresi gen GH pada larva *A. anguilla* meningkat pada temperatur hangat (20-22°C) dan menurun pada temperatur dingin (16°C) (Politis *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Fragmen DNA sepanjang 486 bp berhasil diisolasi, disekuensing, dan teridentifikasi sebagai bagian dari gen hormon pertumbuhan. Sekuen gen hormon pertumbuhan *A. bicolor* memiliki similaritas tinggi jika dibandingkan dengan gen yang sama dari *A. anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica*. Ikan sidat dalam penelitian ini memiliki tingkat ekspresi gen hormon pertumbuhan yang sangat bervariasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Soedirman telah memfasilitasi pendanaan penelitian ini melalui skema Riset Institusi (SK Nomor : Kept. 3715/UN23.14/PN.01.00/2018). Terima kasih juga disampaikan atas fasilitas laboratorium dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Terpadu, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

DAFTAR ACUAN

- Affandi, R., Budiardi, T., Wahju, R. I., & Taurusman, A. A. (2013). Pemeliharaan ikan sidat dengan sistem air bersirkulasi. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 18(1), 55–60.
- Ahlina, H. F., Sudrajat, A. O., Budiardi, T., & Affandi, R. (2015). Induksi pematangan

- gonad secara hormonal pada ikan sidat, *Anguilla bicolor bicolor* McClelland 1844 dengan penggunaan *pregnant mare serum gonadotropin*, anti dopamin, dan *recombinant growth hormone*. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 15(3), 209–221. <https://doi.org/10.32491/jii.v15i3.57>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arief, M., Pertiwi, D., & Cahyoko, Y. (2011). Pengaruh pemberian pakan buatan, pakan alami, dan kombinasinya terhadap pertumbuhan, rasio konversi pakan dan tingkat kelulushidupan ikan sidat (*Anguilla bicolor*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3(1), 61–66.
- Blasco, J., Vélez, E. J., Perelló-Amorós, M., Azizi, S., Capilla, E., Fernández-Borràs, J., & Gutiérrez, J. (2021). Recombinant bovine growth hormone-induced metabolic remodelling enhances growth of gilthead Sea-bream (*Sparus aurata*): insights from stable isotopes composition and proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313107>
- Brooks, C. L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocrine Reviews*, 33(4), 504–525. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1040>
- Daza, D. O., & Larhammar, D. (2018). Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family. *General and Comparative Endocrinology*, 264, 94–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.007>
- Degani, G., Tzchori, I., Yom-Din, S., Goldberg, D., & Jackson, K. (2003). Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels [*Anguilla anguilla* (L.)]. *General and Comparative Endocrinology*, 134(1), 88–93. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00238-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00238-7)
- Dehkhoda, F., Lee, C. M. M., Medina, J., & Brooks, A. J. (2018). The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 35. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00035>
- Deng, S.-P., Wu, B., Zhu, C.-H., & Li, G.-L. (2014). Molecular cloning and dimorphic expression of growth hormone (gh) in female and male spotted scat *Scatophagus argus*. *Fisheries Science*, 80(4), 715–723. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0763-5>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(2), W465-469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Fahmi, M. R. (2015). Konservasi genetik ikan sidat tropis (*Anguilla* spp.) di perairan Indonesia. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 21(1), 45–54. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15578/jppi.21.1.2015.45-54>
- Fahmi, M. R., & Hirnawati, R. (2010). Keragaman ikan sidat tropis (*Anguilla* sp.) di perairan Sungai Cimandiri, Pelabuhan Ratu, Sukabumi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, 2010, 1–10.
- Faizal, I., Aliah, R. S., Amarullah, M. H., Megawati, N., Sutanti, S., & Alimuddin, A. (2012). Produksi protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan kerapu. *Jurnal Riset Akuakultur*, 7(2), 231–235. <http://dx.doi.org/10.15578/jra.7.2.2012.231-235>
- Forlenza, M., Kaiser, T., Savelkoul, H. F. J., & Wiegertjes, G. F. (2012). The use of real-

- time quantitative PCR for the analysis of cytokine mRNA levels. In M. De Ley (Ed.), *Cytokine Protocols. Methods in Molecular Biology, volume 820* (pp. 7–23). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-439-1>
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Pagni, M., & Sigrist, C. J. A. (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Research*, 34(1), D227–D230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj063>
- Jönsson, E., & Bjönsson, B. (2002). Physiological functions of growth hormone in fish with special reference to its influence on behaviour. *Fisheries Science*, 68(1), 742–748. https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup1_742
- Lima, E. R., Freire, R. P., Suzuki, M. F., Oliveira, J. E., Yosidaki, V. L., Peroni, C. N., Sevilhano, T., Zorzeto, M., Torati, L. S., Soares, C. R., Lima, I. D., Kronenberger, T., Maltarollo, V. G., & Bartolini, P. (2023). Isolation and characterization of the *Arapaima gigas* growth hormone (ag-GH) cDNA and three-dimensional modeling of this hormone in comparison with the human hormone (hGH). *Biomolecules*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/biom13010158>
- Marlina, E., & Handayani, M. (2022). Efektifitas rekayasa media budidaya terhadap respon pertumbuhan pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*). *Jurnal Riset Rumpun Ilmu Hewani*, 1(2), 66–75.
- Muttray, A. F., Donaldson, E. M., & Devlin, R. H. (2019). Effects of recombinant salmon type II growth hormone and bovine growth hormone on growth of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(3), 1083–1090. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00620-x>
- Ndandala, C. B., Dai, M., Mustapha, U. F., Li, X., Liu, J., Huang, H., Li, G., & Chen, H. (2022). Current research and future perspectives of GH and IGFs family genes in somatic growth and reproduction of teleost fish. *Aquaculture Reports*, 26, 101289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101289>
- Nguyen, A. T., Damsteegt, E. L., Chia, J. H. Z., Kazeto, Y., & Lokman, P. M. (2022). Effects of gonadotropins, 11-ketotestosterone, and insulin-like growth factor-1 on target gene expression and growth of previtellogenic oocytes from shortfinned eels, *Anguilla australis*, in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(4), 853–867. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01090-4>
- Nugrayani, D., Ekasanti, A., Syakuri, H., Listiowati, E., Soedibya, P. H. T., Marnani, S., Santoso, M., Wijaya, R., Sukardi, P., & Kasprijo, K. (2023). Performa pertumbuhan dan ekspresi gen hormon pertumbuhan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) stadia elver yang diberi pakan mengandung kromium pikolinat. *Jurnal Akuakultur Sungai dan Danau*, 8(1), 13–20.
- Ozaki, Y., Fukada, H., Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Adachi, S., Hara, A., & Yamauchi, K. (2006). Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1), 27–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.009>

- Politis, S. N., Mazurais, D., Servili, A., Zambonino-Infante, J.-L., Miest, J. J., Sorensen, S. R., Tomkiewicz, J., & Butts, I. A. E. (2017). Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PloS One*, 12(8), e0182726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182726>
- Pratama, I., Prayitno, S. B., & Syakuri, H. (2019). Identification and prevalence of parasites in eel (*Anguilla bicolor*) captured along migration pathway at Serayu River, Central Java. *Omni-Akuatika*, 15(1), 81–92.
- Rachmawati, F. N., Susilo, U., & Muslih. (2017). Karakteristik reproduksi ikan sidat *Anguilla bicolor* McClelland, 1844 yang diinduksi GnRH-analog. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 17(2), 155–163.
- Rotwein, P. (2020). Regulation of gene expression by growth hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 507, 110788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110788>
- Sekar, M., Singh, S. D., & Gupta, S. (2014). Cloning and characterization of *Pangasianodon hypophthalmus* growth hormone gene and its heterologous expression. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 1446–1468. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0946-7>
- Setijanto, S., Sulistyono, I., & Eko, B. (2014). Penentuan waktu pengambilan benih dan diet ikan sidat (*Anguilla bicolor* McClelland) di Sungai Serayu. Universitas Jenderal Soedirman.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, 48, 3-13. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Sudo, R., Kawakami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., & Kazeto, Y. (2022). Production of recombinant Japanese eel (*Anguilla japonica*) growth hormones and their effects on early-stage larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 317, 113977. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.113977>
- Teletchea, F. (2021). Fish domestication in aquaculture: 10 unanswered questions. *Animal Frontiers*, 11(3), 87–91. <https://doi.org/10.1093/af/vfab012>
- Teletchea, F., & Fontaine, P. (2014). Levels of domestication in fish: Implications for the sustainable future of aquaculture. *Fish and Fisheries*, 15, 181–195. <https://doi.org/10.1111/faf>
- Triantaphyllopoulos, K. A., Cartas, D., & Miliou, H. (2020). Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: how can aquaculture industry benefit? *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1637–1662. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12402>
- Utomo, D., Alimuddin, A., Sudrajat, A., & Faizal, I. (2011). Produksi dan uji bioaktivitas protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan mas. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10(1), 44–50.
- Yamaguchi, K., Yasuda, A., Kishida, M., Hirano, T., Sano, H., & Kawachi, H. (1987). Primary structure of eel (*Anguilla japonica*) growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 66(3), 447–453. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90256-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90256-5)
- Yeku, O., & Frohman, M. A. (2011). Rapid amplification of cDNA ends (RACE). In H. Nielsen (Ed.), *RNA. Methods in molecular biology*, volume 703 (pp. 107–122). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_8
- Yolla, A., Linggi, Y., & Dahoklory, N. (2020). Pengaruh perbedaan substrat terhadap pertumbuhan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) di dalam wadah budidaya. *Jurnal Aquatik*, 3(1), 51–58.
- Yuan, X., Lin, Y., Qin, J., Zhang, Y., Yang, G., Cai, R., Liao, Z., Sun, C., & Li, W. (2020). Molecular identification, tissue distribution and in vitro functional analysis of growth hormone and its receptors in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 250, 110488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110488>