

KONSTRUKSI VEKTOR EKSPRESI GEN HORMON PERTUMBUHAN LELE DUMBO (*Clarias* sp.) UNTUK PRODUKSI IKAN LELE LOKAL (*Clarias batrachus*) TRANSGENIK

Ibnu Dwi Buwono^{*)#}, Nono Carsono^{**)}, Yuniar Mulyani^{**)}, dan M. Untung Kurnia^{*)}

^{*)} Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran

^{**)} Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

(Naskah diterima: 11 April 2014; Revisi final: 26 Februari 2015; Disetujui publikasi: 11 Maret 2015)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konstruksi vektor ekspresi (pTarget) rekombinan yang mengandung sisipan gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo (*Clarias* sp.) dan promotor β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*) dalam upaya pembuatan ikan lele lokal transgenik. Promotor β -aktin lele lokal (pCbBA) telah berhasil diisolasi dari hipofisa ikan tersebut dengan ukuran sekitar 1,7 kbp; dan memiliki elemen transkripsi CAAT box, TATA box, GC box, motif CArG, dan TGACG berdasar analisis program TF Bind. Penggantian promotor CMV (cytomegalovirus) yang terkandung dalam vektor ekspresi pTarget menggunakan dua enzim restriksi Sgf-I dan I-Ppo I, menghasilkan fragmen DNA berukuran 6.083 bp (pTarget-GH lele dumbo) sebagai produk *digesti*. Fragmen pTarget-GH lele dumbo yang diligasi dengan promotor β -aktin lele lokal membentuk konstruksi pTarget-pCbBA-GH lele dumbo (7.783 bp) sebagai vektor ekspresi ikan lele lokal transgenik.

KATA KUNCI: vektor ekspresi, hormon pertumbuhan, lele dumbo, lele lokal transgenik

ABSTRACT: Construct of growth hormone gene expression vector of African catfish (*Clarias* sp.) to produce transgenic walking catfish (*Clarias batrachus*). By: Ibnu Dwi Buwono, Nono Carsono, Yuniar Mulyani, and M. Untung Kurnia

This study aims to obtain an expression vector construct (pTarget) containing recombinant growth hormone gene insertion of African catfish (*Clarias* sp.) and β -actin promoter derived from walking catfish (*Clarias batrachus*) in order to produce transgenic local catfish. β -actin promoter of walking catfish (pCbBA) have been isolated from the pituitary of the fish with a size of about 1.7 kbp, and has a transcription element: CAAT box, TATA box, GC box, CArG, and TGACG motif based on analysis result of TF Bind program. Replacement of CMV (cytomegalovirus) promoter contained in the expression vector pTarget using restriction enzymes Sgf-I and I-Ppo I, obtained a product of digestion with the fragment size of 6,083 bp (pTarget-GH African catfish). pTarget-GH fragments were ligated with the African catfish β -actin promoter to arrange a construct of pTarget-pCbBA-African catfish GH (7,783 bp) as transgenic walking catfish expression vector.

KEYWORDS: expression vectors, growth hormone, African catfish, transgenic walking catfish

PENDAHULUAN

Aspek penting yang menjadi kunci keberhasilan budidaya ikan (termasuk produksi induk dan benih unggul) adalah penguasaan bioteknologi pembenihan (rekayasa gen dan *breeding*), pakan, proteksi penyakit, dan manajemen (Chen *et al.*, 1997). Rekayasa gen yang dimanfaatkan dalam budidaya ikan ditujukan untuk memperbaiki genetika pertumbuhan, dalam hal ini me-

ningkatkan ekspresi fenotipe pertumbuhan sebagai upaya meningkatkan produksi hasil budidaya.

Produksi ikan lele lokal (*Clarias batrachus*) unggul melalui program seleksi, memerlukan waktu lebih lama, lambatnya pewarisan gen terseleksi pada keturunan dari ikan yang diseleksi. Hal ini menjadikan pembudidaya ikan lele lokal beralih ke budidaya ikan lele dumbo (*Clarias* sp.), oleh karena sifat pertumbuhan lele lokal yang lambat walaupun rasa dagingnya lebih enak dibandingkan lele dumbo.

Selama dekade terakhir, spermatozoa pada ikan telah banyak diteliti peranannya dan dapat bertindak

Korespondensi: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran. Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor 40600, Indonesia. Tel.: + (022) 7797763
E-mail: ibnudw1@yahoo.com

sebagai vektor untuk transfer gen asing dalam teknologi ikan transgenik yang dikenal sebagai transfer gen yang diperantarai sperma (SMGT = *Sperm Mediated Gene Transfer*) (Collares *et al.*, 2010). Secara alami, hewan akuatik memproduksi sejumlah besar sel-sel sperma yang sangat menguntungkan bagi aplikasi teknik SMGT tersebut. Rekayasa genetika, khususnya teknologi rekombinan DNA mulai banyak diaplikasikan di bidang pembenihan ikan guna meningkatkan pertumbuhan melalui penyisipan gen hormon pertumbuhan tersebut ke dalam DNA genom telur atau sperma ikan.

Sejauh ini telah banyak usaha dilakukan untuk mengatur hormon-hormon pada ikan atau dengan rekombinasi hormon dari mamalia dalam plasmid yang diintegrasikan pada genom ikan sehingga dapat memproduksi hormon dalam jumlah banyak, meningkatkan pertumbuhan, dan efisiensi pakan (Chen & Powers, 1990).

Pemberian hormon pertumbuhan alami mamalia ke dalam pakan ikan maupun dengan cara perendaman hormon tersebut ke dalam telur-telur ikan dipandang tidak efisien, karena setiap akan memproduksi ikan unggul, pekerjaan harus dilakukan berulang-ulang untuk maksud tersebut. Sebaliknya dengan mengintegrasikan gen asing yang mengekspresikan hormon pertumbuhan ke dalam inti sel ikan dan kemudian dibesarkan sampai induk lebih efisien untuk mewariskan sifat pertumbuhan pada keturunannya.

Perkembangan metode transfer gen secara massal sangat penting, mengingat tingginya jumlah telur ikan dan fertilisasi eksternal. Teknologi DNA rekombinan pada ikan dan sekuen-sekuen regulatorik (sekuen promotor) telah dapat dikloning dan potensial dimanfaatkan untuk pembuatan konstruksi vektor ekspresi yang mengandung gen-gen ikan yang bernilai ekonomis (Muller *et al.*, 1993; Dewi *et al.*, 2010a). Pengujian sekuen-sekuen regulatorik yang dikloning (termasuk sekuen promotor), secara *in vivo* fungsional untuk mempermudah ekspresi transgen yang disisipkan melalui sperma untuk produksi massal ikan transgenik (Alimuddin *et al.*, 2007; Sin *et al.*, 1997). Produksi transgen secara stabil memerlukan waktu dari generasi ke generasi, mengingat tidak 100% transformasi gen ikan melalui elektroporasi sperma berhasil diwariskan ke telur ikan.

Penggunaan promotor β -aktin *yellow catfish* (Ge *et al.*, 2012) ke dalam konstruksi vektor ekspresi rekombinan yang mengandung gen hormon pertumbuhan (*Growth Hormone*/GH) lele dumbo yang ditransfer ke sperma ikan lele lokal (*Clarias batrachus*) melalui teknik SMGT ini diharapkan dapat meningkatkan ekspresi transgen tersebut dalam DNA genom larva lele, mengingat promotor β -aktin *Clarias batrachus* dapat

dikenali oleh elemen transkripsi dan ekspresi dalam DNA genom ikan lele lokal.

Berlandaskan uraian di atas, bahwa penelitian SMGT (mengandung sisipan gen GH lele dumbo) pada ikan lele lokal (*Clarias batrachus*) masih terbatas diterapkan, maka diperlukan penelitian perakitan konstruksi vektor ekspresi GH lele dumbo dalam upaya pembuatan ikan lele lokal transgenik.

Target penelitian yang ingin dicapai adalah pembuatan konstruksi vektor ekspresi gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo yang fungsional dapat terintegrasi dalam DNA genom sperma ikan lele lokal untuk tujuan produksi ikan lele lokal transgenik. Tujuan umum dilakukan penelitian tersebut untuk memperbaiki sifat pertumbuhan lele lokal dari sifat pertumbuhan asalnya yang lebih meningkat dengan mentransfer GH lele dumbo ke dalam genom sperma lele lokal.

Hasil yang diharapkan dari penelitian adalah memberikan kontribusi kepada pembudidaya ikan air tawar untuk membudidayakan kembali lele lokal yang pertumbuhannya sama dengan lele dumbo sehingga produksi meningkat dan sebagai upaya penyediaan pangan nasional, serta stabilitas perikanan budidaya berkelanjutan.

BAHAN DAN METODE

Sampel yang digunakan untuk melipatgandakan fragmen DNA hormon pertumbuhan ikan lele dumbo dan DNA promotor β -aktin ikan lele lokal berasal dari hipofisa ikan tersebut. Isolasi RNA hipofisa dari ikan lele dumbo dilakukan menggunakan *high pure RNA tissue kit*, primer ORF-Cg-GH-F (5'-ATGGCTCGAGTTT TGGTGCTGCT-3') dan ORF-Cg-GH-R (5'-CTACAGAGTG CAGTTGGAATCCAGGG-3') (Zhang *et al.*, 2009); serta *onestep RT-PCR kit* (Qiagen) untuk mengamplifikasi gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo. Primer pBA-Cs-F (5'-GTGWGTGACGCGYGGACCAATC-3') dan pBA-Cs-R (5'-CCATRTCTCCAGTTGGTSACAAT-3') (Ge *et al.*, 2012) digunakan untuk mengamplifikasi promotor β -aktin ikan lele lokal. Vektor pGEM-T digunakan untuk kloning gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo dan promotor β -aktin ikan lele lokal, pTARGET™ digunakan sebagai vektor ekspresi gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo dan *kit plasmid genaid* untuk mengisolasi promotor-promotor β -aktin ikan lele lokal dan gen hormon pertumbuhan ikan lele dumbo yang dikloning dalam bakteri *Escherichia coli*.

Perakitan Konstruksi Vektor Ekspresi pTARGET-Promoter CMV dan pTARGET-Promoter *CbBA*

Transgen yang digunakan untuk produksi ikan lele lokal transgenik terbagi atas dua macam kons-

truksi vektor ekspresi yaitu: (1) pTARGET-CMV-CgGH dan (2) pTARGET-pCbBA-CgGH. Konstruksi pTARGET-CMV-GH lele dumbo yang dirancang disajikan pada Gambar 1 dan konstruksi pTARGET-CbBA-GH lele dumbo disajikan pada Gambar 2, yang mengganti promoter CMV dengan promoter β -aktin *Clarias batrachus* (pCbBA).

Inseri promoter β -aktin *Clarias batrachus* (pCbBA) ke pTARGET, dengan cara men-*digesti* vektor tersebut dengan enzim restriksi *Sgf I* dan *I-Ppo I*, kemudian disambungkan (diligasi) dengan sekuen promoter pCbBA. Sebelum dilakukan penyisipan promoter pCbBA, sekuen promoter tersebut dianalisis menggunakan program TF Bind (*Transcription Factor Binding*) untuk memastikan sekuen promoter tersebut telah memiliki sekuen fungsional yaitu: CAAT box, TATA box, dan motif CARG yang penting untuk mendorong transkripsi gen GH lele dumbo yang diinsersikan dalam konstruksi vektor pTARGETTM-CbBA-GH lele dumbo tersebut. Promoter CMV pada vektor pTARGETTM diganti (*replacement*) dengan promoter pCbBA, dengan memotong (*digesti*) sekuen CMV menggunakan dua enzim restriksi (*Sgf-I* dan *I-Ppo I*) pada pTARGET untuk membuang sekuen CMV, kemudian menyisipkan promoter pCbBA tersebut ke dalam vektor.

Proses *digesti* vektor dilakukan dengan melarutkan 5 μ L pTARGET; 2 μ L 10x buffer RE; 0,5 μ L BSA; 1 μ L enzim *Sgf-I*; 1 μ L enzim *I-Ppo I*; dan 11,5 μ L SDW. Reaksi *digesti* diinkubasi selama tiga jam pada suhu 37°C.

Proses ligasi dilakukan dengan mencampurkan 3 μ L promoter pCbBA; 1 μ L T4 DNA ligase 10x; 1 μ L enzim T4 DNA ligase; 4 μ L SDW; dan 1 μ L pTARGET yang telah dipotong dengan enzim *Sgf-I* dan *I-Ppo I*. Inkubasi dilakukan selama dua jam pada suhu ruang

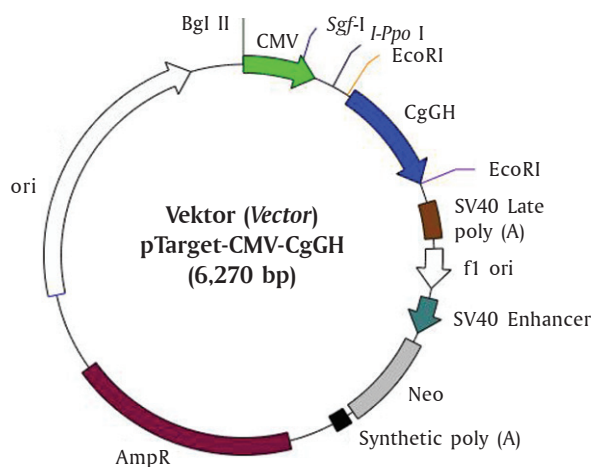
dan dilanjutkan semalaman pada suhu 4°C. Peta konstruksi pTARGET-pCbBA-GH lele dumbo disajikan pada Gambar 2.

Transformasi Vektor Ekspresi Rekombinan (pTARGETTM-gen GH Lele Dumbo) pada Sel Kompeten *E. coli* JM 109

Setelah pembuatan vektor ekspresi rekombinan, pengerjaan selanjutnya mengkloning vektor tersebut ke dalam sel kompeten, untuk memperoleh kopi-kopi hormon pertumbuhan lele dumbo secara *in vivo*. Sebelum dilakukan proses kloning gen GH lele dumbo, dibuat terlebih dahulu medium tumbuh sel kompeten *E. coli*. Medium tumbuh yang dibutuhkan ada dua macam, yaitu: (1) medium untuk kultur cair sel kompeten, terbuat dari 40 g *Circle grow broth* yang dicampur dengan 1 liter milliq H₂O steril, dan (2) medium kultur padat (*solid*) yang terbuat dari campuran 25 g *Luria Bertani* (LB) *broth* (LB *broth*) dengan 15 g *Bacto agar* dalam 1 liter milliq H₂O steril. Medium kultur padat tersebut kemudian di-*plating* ke dalam cawan petri sesuai dengan jumlah kebutuhan. Sedangkan untuk medium kultur cair dilakukan di dalam tabung reaksi dengan jumlah volume medium 5 mL dan ditambahkan ampicillin sesuai kebutuhan.

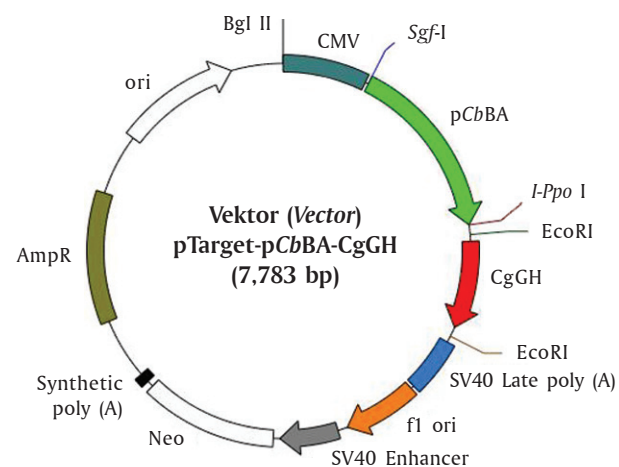
Untuk meningkatkan pertumbuhan sel, diperlukan medium SOC, serta untuk menginduksi koloni agar tumbuh dalam kultur padat ditambahkan IPTG dan X-gal. Seleksi koloni putih (hanya mengandung *insert* ORF-Cg-GH) dilakukan dengan penambahan antibiotik ampicillin pada medium kultur tersebut.

Secara garis besar, protokol teknik kloning dan transformasi produk ligasi dalam vektor kloning dan vektor ekspresi yang ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* JM 109 dipaparkan sebagai berikut;



Gambar 1. Konstruksi pTARGETTM-CMV-CgGH (6.270 bp)

Figure 1. Construction pTARGETTM-CMV-CgGH (6,270 bp)



Gambar 2. Konstruksi vektor pTARGETTM-pCbBA-CgGH (7.783 bp)

Figure 2. Vector construction pTARGETTM-pCbBA-CgGH (7,783 bp)

dipersiapkan dua *plate* LB/ampicillin/IPTG/X-gal untuk setiap reaksi ligasi. Tahap selanjutnya dilakukan sentrifugasi *tube-tube* yang mengandung reaksi ligasi untuk mengumpulkan kandungannya pada dasar *tube*, kemudian ditambahkan 2 μ L setiap reaksi ligasi ke mikrotube 1,5 mL steril *on-ice*. Segera diambil *microtube-microtube* beku sel kompeten JM 109 dari penyimpanan -80°C dan ditempatkan dalam styrofoam berisi timbunan es curai hingga mencair (kira-kira lima menit). Sel-sel dicampurkan dengan teknik *flicking* (menjentik-jentikan *tube* dengan jari tangan). Dengan ekstra hati-hati, 50 μ L sel kompeten JM 109 ditransfer ke dalam setiap *tube* berisi campuran reaksi ligasi yang telah dipersiapkan sebelumnya. Secara perlahan-lahan, menjentik-jentikan *tube* untuk mencampur dan kemudian segera ditempatkan *on ice* dalam styrofoam selama 20 menit.

Sebelum transformasi, dipersiapkan *waterbath* (dengan suhu stabil 42°C), dan segera dilakukan *heat shock* (kejutan panas) sel-sel kompeten yang telah dicampur reaksi ligasi selama 90 detik (tidak boleh digoyang-goyang). Segera dikembalikan *tube-tube* ke styrofoam berisi es curai selama dua menit. Proses dilanjutkan dengan menambahkan 950 μ L medium SOC pada suhu ruang ke dalam sel-sel kompeten tersebut untuk masing *tube-tube* yang telah dilabel. Tahap akhir dilakukan inkubasi selama dua jam pada suhu 37°C dengan *shaking* (penggoyangan) kecepatan 125 rpm menggunakan *shaking waterbath*.

Amplifikasi Sekuen Promoter β -Aktin Lele Lokal

DNA genom ikan lele lokal digunakan sebagai *template* untuk mengkopi sekuen promotor β -aktin lele tersebut menggunakan primer pBA-Cs-F (5'-GTGWWG TGACGCGYGGACCAATC-3') dan pBA-Cs-R (5'-CCATRT CRTCCAGTTGGTSACAAT-3') yang dirujuk dari Ge *et al.* (2012).

Campuran reaksi PCR (*polymerase chain reaction*) dalam volume akhir 25 μ L yang mengandung 12,5 μ L *fast start PCR master mix* (Roche); 1,5 μ L pBA-Cs-F (10 μ M); 1,5 μ L pBA-Cs-R (10 μ M); 2,5 μ L DNA genom lele; dan 7 μ L *nuclease free water*. Penggandaan sekuen promotor tersebut dilakukan dengan pengaturan program PCR : pra-denaturasi 95°C selama lima menit; denaturasi 94°C selama satu menit; *annealing* 62°C selama 45 detik; ekstensi 72°C selama dua menit dengan jumlah siklus sebanyak 30 kali replikasi dan ekstensi akhir 72°C selama sepuluh menit.

Pengerjaan dilanjutkan dengan elektroforesis produk PCR di atas dalam gel agarose 1%. Kondisi elektroforesis sebagai berikut: tegangan listrik 75 volt, waktu 90 menit, perendaman dalam *ethidium bromide* selama 20 menit, dan pencucian dalam akuades steril selama 15 menit.

Sekuensing Promoter β -Aktin Ikan Lele Lokal

Analisis sekuen DNA promotor β -aktin lele lokal dilakukan untuk verifikasi keberadaan elemen-elemen transkripsi yang terkandung dalam sekuen tersebut, seperti halnya yang telah dilakukan untuk analisis promotor *grass carp* (Li *et al.*, 2007). Sekuensing dilakukan di PT Genetika Science Indonesia (1st Base Singapore) dan sekuen tersebut diverifikasi dengan menyejajarkan (*alignment*) elemen transkripsi sekuen promotor β -aktin lele lokal (*C. batrachus*) dengan elemen transkripsi sekuen promotor β -aktin *Indian catfish* (*Heteropneustes fossilis*) dan *yellow catfish* (*Pelteobagrus fulvidraco*) yang terdapat di Bank Gen dengan program GENETYX versi 7.

HASIL DAN BAHASAN

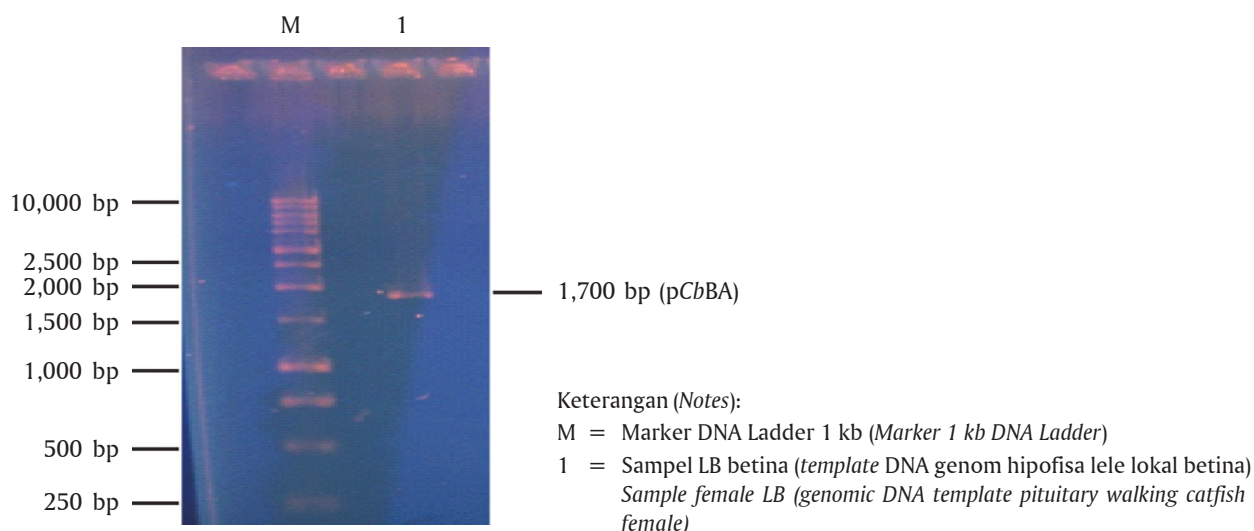
Amplifikasi Fragmen Promoter β -Aktin Lele Lokal

Amplifikasi sekuen promotor β -aktin lele lokal (pCbBA) dilakukan menggunakan primer pBA-Cs-F dan pBA-Cs-R merujuk hasil penelitian Ge *et al.* (2012). Hasil amplikon (produk PCR) yang telah diperoleh sekitar 1.700 bp, dan dilanjutkan dengan mengirimkan sampel produk PCR ke jasa service sekuensing 1st Base Singapore melalui PT Genetika Science Indonesia, Jakarta untuk meyakinkan bahwa sekuen tersebut merupakan sekuen promotor (menggunakan program *Promoter Scan*). Gambar 3 merupakan hasil amplifikasi sekuen promotor pCbBA, dengan ukuran fragmen sekitar 1.700 bp.

Ukuran fragmen promotor β -aktin lele lokal ini tidak jauh berbeda dengan ukuran fragmen promotor β -aktin *yellow catfish* yang telah diteliti Ge *et al.* (2012) sebesar 1.617 bp. Amplifikasi pada produk PCR promotor β -aktin lele lokal tersebut menandakan, fragmen yang terkopi oleh primer pBA-Cs-F dan pBA-Cs-R diprediksikan merupakan sekuen promotor β -aktin lele lokal.

Verifikasi hasil sekuensing produk PCR pada Gambar 3 menggunakan *software Promoter Scan* versi 1.7 diperlukan untuk menentukan apakah sekuen tersebut mengandung CAAT box, TATA box, dan motif CarG yang diketahui penting dalam aktivitas promotor β -aktin.

Ketiga elemen transkripsi (CAAT box, motif CarG, TATA box) pada sekuen promotor β -aktin ikan lele lokal β -aktin ikan lele lokal terdeteksi secara manual. Faktor transkripsi (TFIID) yang terikat dengan elemen TATA box untuk menginisiasi transkripsi terdeteksi dengan program ProScan versi 1.7 secara *on line* (Gambar 4). Lokasi elemen CAAT box terdapat pada nukleotida (nt.) 22-29, motif CarG pada nt. 615-623, elemen TATA box pada nt. 49-54, dan nt. 296-302 untuk



Gambar 3. Fragmen pCbBA (1.700 bp)

Figure 3. Fragment pCbBA (1,700 bp)

```

1      TANGNNNTCTTCGAAAAGGGTCCATTTTAGACGGCCATGTGGAGCGTA
51     TAAAAACAGGCGCCAGACTCCCACTTCACTTTGAGCTCCTCCACACGCA
101    GCTAGTGCGGAATATCATCTGCCAACCAAATTTATTTTTTCTTAAGCCG
151    ACAACCCCAAATCTTAAGGTAAGTTTTTTTCCCTTTCCTCCTGGTAT
201    TGTATTACTGTAGCAATAGTAATTGCAGTAACAATAGTAACATTGCTA
251    TTTATGTATGCAAGGGTTTTAATTGTAAAACTATATATATATTTTATA
301    AATTAAATGAATGACTGCAAAAAGAACAATACGTTTTCCCTTTATCATGCA
351    GCGATATTAAGTAGACAGGAATTATTTTTGTAAATTTTTACCTCAGGTT
401    TTTTTTTTTTTTTTCCCTGGGGGCTAAAAGCCCCGTAAAACGGCGGGGAGG
451    GGGGGGTTTTTTTTTATTTCTATAAATGAAAAACCGTTTTTTGCCCTGA
501    TTATTAAAAAGCGGAGGAAGACCCGTATTTGTGACGATAATCACAAAAA
551    AAGCGGGGGCGGGGGGCTCCCCCGTTTTTTCCACCTCCCCCGGAGAG
601    GGTAGGATTTCCCCAAATTGGGACAACGAGACCCCTGGGGTAATTCGCT
651    GCCTACCCCTGGGCACTTGAAAAGGGGGGCCAGTCGTGCTTAAGGCTGT
701    CAAGCCAAGAGGCTCCCCCATTTTTTTCTCGCTAGGGGGGGGGGCCAGA
751    AAAAATAATATATTTTTTTTATTTTATACCTACTTCCTCACAACTGTACA
801    AAAAAAGCCACTGACGAGCTCTTGTTATTACAACACCCAGAGATATTGT
851    CCGTCTTATAATTTTTTTTTCTAAAGCGGCCACAAAGCGGACCACACT
901    TAAATCATAGTTAAGTAAGGCCGCTTGTTGGTGAGCAAGTATACAGGAC
951    CGGGAAGTAGAGATAGAATGAGTTGATAAAATTAAAATATAAATTTGTTC
1001  AGNNTGAACGGAGGCCTGCCCGGGCTCTGCAGATN
    
```

Keterangan (Notes):

~~TATAAA~~ = Sekuen core promoter (Promoter core sequence)
~~CAAT~~ = Sekuen enhancer (Enhancer sequence)
~~CCAAAT~~ = CCAAT box
~~CAAATTGG~~ = Motif CarGG (CarGG motive)

Gambar 4. Motif CarG, CAAT box dan TATA box pada sekuen promoter β -aktin lele Lokal (arah forward)

Figure 4. The motive CarG, CAAT box and TATA box of the promoter sequence of β -actin walking catfish (forward direction)

promoter β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*), sementara pada *Indian catfish* (*Heteropneustes fossilis*, no. akses AY 531754), terletak pada nt. 343-347 (CAAT box), elemen CarG pada nt. 372-381, serta nt. 345-350 (elemen TATA box). Elemen transkripsi penting promoter β -aktin semua vertebrata direpresentasikan oleh CAAT box, motif CarG, dan TATA box yang terkandung dalam sekuen promoter tersebut (Hew & Fletcher, 2001). CAAT box merupakan enhancer yang diperlukan untuk meningkatkan level transkripsi, motif-motif CarG terlibat dalam pengaturan transkripsi basal dan elemen TATA box berperan dalam pengaturan transkripsi gen fungsional yang terletak pada *proxi-*

mal promoter (Aranburu *et al.*, 2006; Santoro & Walsh, 1991).

Elemen lain yang penting dalam penentuan situs pengikatan RNA polimerase II ketika transkripsi akan berlangsung adalah GC box (sekuen GGGCGGG) dan motif TGACG yang berperan sebagai perantara faktor hormon pertumbuhan dari hipofisa (Argenton *et al.*, 1996) pada sekuen promoter β -aktin *catfish*. Hasil penjabaran elemen-elemen transkripsi antara promoter β -aktin ikan lele lokal dan *Indian catfish* (*H. fossilis*) menggunakan program Genetyx versi 7.0 disajikan dalam Gambar 5. Motif TGACG pada promoter β -aktin *C. batrachus* pada nt. 814-818.

Verifikasi penjajaran elemen transkripsi antara promoter β -aktin ikan lele lokal dan *yellow catfish* (*Pelteobagrus fulvidraco*) juga mengindikasikan keberadaan ketiga elemen transkripsi dalam promoter β -aktin kedua jenis *catfish* tersebut (Gambar 6).

Elemen *CAAT box* sebagai sinyal untuk faktor transkripsi RNA polimerase terletak di depan elemen *TATA box*, pada posisi nt. 35-42 untuk promoter β -aktin *C. batrachus* dan posisi nt. 16-19 untuk *P. fulvidraco* (Gambar 6). Motif *CarG* terletak pada nt. 615-623 (pro-

```

C. batrachus.txt 0:----- 0
H. fossilis.txt 1:CAACATATCTTGCACTTCCAGACTGAAATCTTGAGAGACAGGTTTAAAGAGGAAAAGTA 60

C. batrachus.txt 0:----- 0
H. fossilis.txt 61:TTACAGGGAGGAGCAGCCTGTGCTCTGCTGTGTTGAATGATCAGATAAGCAGGGGGAC 120

C. batrachus.txt 0:----- 0
H. fossilis.txt 121:TTGCTCGACAGCTTTATACAGGTTTCATATTTTATATTTATTTATTTGAACCTTTGTAAA 180

C. batrachus.txt0:----- 0
H. fossilis.txt 181:CCTCTATATGTATTAAATATTGTTCAGAACATATATCTTAGATTAGGCCTCACATCAAT 240

C. batrachus.txt 0:----- 0
H. fossilis.txt 241:CCCTTTTCCCTAGCCGTTACTGTTATCGCCTCCCTCTTCTACGCTACGCTCAGTGCA 300

C. batrachus.txt 1:-----TANGNNNTCTTC 13
H. fossilis.txt 301:CCACAGCGTGACCCGACGTGCCCGAGTGAGTGACGCTGGACCAATCACAGCCGCGATTTC 360

C. batrachus.txt 14:CGAAAAGGTCCTATT---TAGACGGCCATGT---GGAGCG--TATAAA-ACCAGGCGCC 64
H. fossilis.txt 361:CGAAAGTTTACCTTTTATGAAAGGCGCGGCAACGGACGGACATATAATACCACGCCCA 420

C. batrachus.txt 65:CAGACTCCCACTTCACTT-TGAGCTCCTCCACACGACGCTAGTGCGGAATATCATCTGCC 123
H. fossilis.txt 421:CGGCTAGCAAATTCACACTGAGCGCGCTCACAC-CAGCTTGTGCGGA-TATCATTCGCC 478

C. batrachus.txt 124:C--AACCAAAATTTATTTTCTTAAGCCGACAACCCCCAAATCTTAAGTAAGTTTTTT 181
H. fossilis.txt 479:TGAACCGATTCCCTTGAACTCATGCTT----- 507

C. batrachus.txt 182:CCCCCTTCCCTCGGTATTGTTATTACTGTTAGCAATAGTAATTGCAGTAACAATAGTA 241
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 242:ACATTGCTATTATTATGTATGCAAGGGTTTTAATTGTAAAACTATATATATTTTTTATAA 301
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 302:ATTAATGAATGACTGCAAAAGAACAATACGTTTCCCTTTATCATGCAGCGATATTAA 361
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 362:CTAGACAGGAATTATTTTGTAAATTTTACCTCAGGTTTTTTTTTTTTTCCCTGGGG 421
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 422:GCTAAAAGCCCCGTAAAACGGCGGGGAGGGGGGGTTTTTTTTTATTCTATAAATGAAA 481
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 482:AAACCGTTTTTTGCCCTGATTATTAATAAGCGGAGGAAGACCCGATTGTCGACGATA 541
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 542:TCACAAAAAAGCGGGGGCGGGGGCCCTCCCCGTTTTTCCACCTCCCCCGGAGAGG 601
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 602:GTAGGATTTACCCAAATTTGGGACACGAGACCCCTGGGGTAATTCGCTGCCTACCCCTG 661
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 662:GGCACTTGAAAAGGGGGGCCAGTCGTGCTTAAGGCTGTCAAGCCAAGAAGGCTCCCCCA 721
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 722:TTTTTTCTCGCTAGGGGGGGGGCCAGAAAAATAATATTTTTTTTATTATTATACCT 781
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 782:ACTTCCTCACAACGTACAAAAAAGCCACTGACGAGCTCTTGTATTACAACACCCAG 841
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 842:AGATATTGTCGCTTTATAATTTTTTTTCTAAAGGCGCCACAAGCGGACCACACACTT 901
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 902:AAATCATAGTTAAGTAAGGCCGCTTGTGTTGAGCAAGTATACAGGACCGGGAAGTAGA 961
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt 962:GATAGAATGAGTTGATAAAATTAATATAAATTTGTTCAAGNNTGAACGGAGGCTGCC 1021
H. fossilis.txt 507:----- 507

C. batrachus.txt1022:GGGCTCTGCAGAT 1034
H. fossilis.txt 507:----- 507

```

Keterangan (Notes):

CAAT box = Sekuen conserved (Conserved sequence) GGCCAATCT (CCCCAATCT)
 CarG = Sekuen conserved (Conserved sequence) CC(A/T)₆GG
 TATA box = Sekuen conserved (Conserved sequence) TATAAA
 GC box = Sekuen conserved (Conserved sequence) GGGCGGG
 TGACG = Faktor pertumbuhan dari hipofisa (Factor of pituitary growth)

Gambar 5. Penjajaran elemen transkripsi promoter β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*) dan *Indian catfish* (*H. fossilis*)

Figure 5. Transcription element alignment β -actin promoter walking *catfish* (*C. batrachus*) and *Indian catfish* (*H. fossilis*)

C. batrachus.txt	0:-----	0
yellow catfish.txt	1:GTGAGTGCGCC GGACCAAT CAGACGAAGCGATGCCGAAAGTTTACCTTATATGGAGTTG	60
C. batrachus.txt	0:-----	0
yellow catfish.txt	61:CCGGCCACAGTGCCGGG TATAAA TACAGCGTCGCCCCGGTTAAGCTGCCACTCTGAGTTT	120
C. batrachus.txt	0:-----	0
yellow catfish.txt	121:GCCTGTGCACGAGTCTAGAAGGACATTAATTCAGCTATATTCCTGTGAACCACTGATT	180
C. batrachus.txt	0:-----	0
yellow catfish.txt	181:CTTTGGTAAGATCAGCTTTATCTTTGTCTACATACGATTGTGATTATAACTACATCCTCT	240
C. batrachus.txt	1:-----TANGNNNTCTTCCGAAAAGGGTCCATTTTAGAC GGCCATGT	42
yellow catfish.txt	241:TTCTACCTTAAATCTATTTTATTGTTTATTAAACGATGTACCTGATTATATCGAGTT	300
C. batrachus.txt	43:GGAGCG TATAAA CCAGGCGCCAGACTCCCACTTCTAGCTCCTCCACGCGAGC	102
yellow catfish.txt	301:GG--CGTTTATTTCAGTGCTTCC--CTGTACATGAGCTCTGGGTTATGAT GTACG TTAT	355
C. batrachus.txt	103:TAGTGCGGAATATCATC-TGCCCAACCAATTTATTTTCTTAAGCCGACACCCCAA	161
yellow catfish.txt	356:TAATGTGTTCTATAATGATTATAGAGAGATTCTGTTACTAGTGAAGGAGAACTG--A	413
C. batrachus.txt	162:ATCTTAAGGTAAGTTTTTTTCCCTTTCTCCTGCTGTTGTTTACTGTTAGCAATAG	221
yellow catfish.txt	414:GACAATACAAAGATTATTAATACAGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG	473
C. batrachus.txt	222:TAATTGCAGTAACAATAGTAACATTGCTATTTATGATGCAAGGGTTTAAATGTA	281
yellow catfish.txt	474:TGTGTGT-GTGAGAGATG---CTGTGGTGTAAAGTTAGATGTGGGTGTGGCTGCTGTG	529
C. batrachus.txt	282:CTATATATATATTTT TATAAA TAAATGAATGACTGCAAAAGAAACAATACGTTTTCCCTT	341
yellow catfish.txt	530:ATGCAGCT-TAGCTTCAGTTGTCTTCAGAAACATTATAATGAAGTTGCATGATTAAAT	588
C. batrachus.txt	342:TATCATGCAGCGATATTAACTAGACAGGAATTATTTTGTAAATTTTACCTCAGGTTT	401
yellow catfish.txt	589:TACC--TCAGTGAAATTAATTAATTTCTGGATTAAAAAA--AACCTGTTAAGTTATACAG	645
C. batrachus.txt	402:TTTTTTTTTTTCCCTGGGGGCTAAAAGCCCCGTAAAACGCGCGGGGAGG----GGGGG	456
yellow catfish.txt	646:TAAAGCTACAGTTGCTGCAG--TAAATTAACATGATTGGTGAGCAGGTTTTGGAGAG	703
C. batrachus.txt	457:TTTTTTTTTATTCT TATAAA TGAAAAACCGTTTGTGCCCTGATTATTAAGGCGGAG	516
yellow catfish.txt	704:CAGGTTTTTTGTGTACAA-TGTGGGACTCGATCATGGACCC--TTCAGCAGGCGCAT	759
C. batrachus.txt	517:GAAGACCC-GTATTTGTGACGA-TAATCACAAAAAGCGG GGGCGGG GGGCCCTCCCC	574
yellow catfish.txt	760:AATGAGGCTGTAAAAAAGGGGAGTGGTCCGCTCTCACGAGCCGTCGAACCTATTACCA	819
C. batrachus.txt	575:GTTTTTCCACCTCCCCCGGAGAGGGTAGGATTTTAC CCAAATGGG -ACAACGAGAC	633
yellow catfish.txt	820:TATAAGGCAATAGCGAGTCTGTTGGCCACTTCCTTTGTCTCAAACGCCAGTTTGGG	879
C. batrachus.txt	634:CCCTGGGGTAATTCGCTGCCTACCCCTGGGC-----ACTTGAA--AAGGGGG-GCC	681
yellow catfish.txt	880:CTTTGCGCATGTGCGCCACCTGCTGGTGATATATATTTTTTTAAATAAAGGGTGTGTG	939
C. batrachus.txt	682:CAGTCGTGCTTAAG--GCTGTCAAGCCAAGAAGGCTCCCCATTTTTTCTCGTAGGGG	739
yellow catfish.txt	940:CATTCTACAGCAGATGCTGAATTACCCCTTGTTCTAAATGACCTGGTCACTTAACCTC	999
C. batrachus.txt	740:GGGGGGCCAGAAAAAATAATATTTTTTTTATTTATACCTACTTCTCACAACGTAC	799
yellow catfish.txt	1000:TTTGTGTTCTCCACAGCCATGGATGATGAA-ATTGCCGCACTGTTGTTGACAACGGATC	1058
C. batrachus.txt	800:AAAAAAAGCCACT GCAG GAG-CTCTTGTTATTACAACCCAGAGATATTGTCGCTCTTA	858
yellow catfish.txt	1059:CGGTATGTGCAAGGCTGGATTGCTGGAGATGATG-CTCCCCGTGCTGTCTTCC--CATC	1115
C. batrachus.txt	859:TAATTTTTTTTCTAAAGGCGCCACAAAGCGGACCACACACTTAAATCATAGTTAAGTAA	918
yellow catfish.txt	1116:CATTGTTGGTCGCCCAAGACACCAGGTA-CGAACCACACAATC---TGCCTCTTATGGAA	1171
C. batrachus.txt	919:GGCGCCTTGTGGTGAGCAAGTATACAGGACCGGGAAGTAGAGATAGAATGAGTTGATA	978
yellow catfish.txt	1172:G-CTTAATTGTT--TAACTATTTTAAATATTATTAA--AAACCAAGGGTGCTCAAACT	1226
C. batrachus.txt	979:AAATTAAATATAAATTTGTTTCAGNNTGAACGAGGCGCTGCCCGGCTCTGCAGAT---	1034
yellow catfish.txt	1227:ATTTTAAAGGATA CTGTGTAGG TTTGAACAATGGCACAACCTTCATCATAGGAGCTTG	1286

Keterangan (Notes):

CAAT box = Sekuen conserved (Conserved sequence) GGCCAACTCT

CArG = Sekuen conserved (Conserved sequence) CC(AT)₆GG

TATA box = Sekuen conserved (Conserved sequence) TATAAA

GC box = Sekuen conserved (Conserved sequence) GGGCGGG

TGACG = Faktor pertumbuhan dari hipofisa (Factor of pituitary growth)

Gambar 6. Penjajaran elemen transkripsi promotor β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*) dan yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

Figure 6. Transcription element alignment β -actin promoter walking catfish (*C. batrachus*) and yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

moter β -aktin *C. batrachus*) dan terletak pada nt. 1232-1241 untuk *P. fulvidraco*. Boks TATA sebagai core promoter untuk ikan lele lokal (*C. batrachus*) terletak pada nt. 49-54 dan nt. 296-302, serta 472-477, sementara untuk *P. fulvidraco* pada posisi 78-83. Pada promotor β -aktin *C. batrachus*, motif TGACG terletak nt. 814-

818, sedangkan pada *P. fulvidraco* pada nt. 348-352. GC box hanya terdapat pada promotor β -aktin *C. batrachus* pada posisi nt. 558-564. Berdasarkan interpretasi penjajaran elemen-elemen transkripsi (CAAT box, motif CArG, dan TATA box) yang terkandung dalam sekuen promotor β -aktin ikan lele lokal dengan Indian

catfish dan *yellow catfish* (Gambar 5 dan 6), memperkuat keyakinan bahwa sekuen yang teramplifikasi adalah promoter β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*).

Interaksi di antara elemen-elemen transkripsi termasuk motif TGACG yang terkandung dalam sekuen promoter β -aktin ketiga jenis *catfish* tersebut sangat dibutuhkan untuk mencapai kadar tinggi transkripsi (Fletcher & Hew, 2001).

Berdasarkan hasil pengolahan sekuen dengan program *TF Bind* pada sekuen *pCbBA*, diperoleh sekuen TATA box yang merupakan *core* promoter, sekuen CAAT yang mengindikasikan sekuen *enhancer*, sekuen CCAT box, dan motif CArGG, sehingga terbukti bahwa sekuen yang terkopi oleh primer pBA-Cs-F dan pBA-Cs-R adalah promoter β -aktin lele lokal.

Verifikasi Sisipan GH Lele Dumbo dalam *E. coli* JM 109 Pembawa pTarget Rekombinan

Hasil isolasi vektor rekombinan yang mengandung pTarget dengan sisipan gen GH lele dumbo, dideteksi menggunakan primer ORF-GH-F dan ORF-GH-R dan elektroforesis gel agarose 0,8%. Elektroforegram hasil deteksi tersebut disajikan pada Gambar 7.

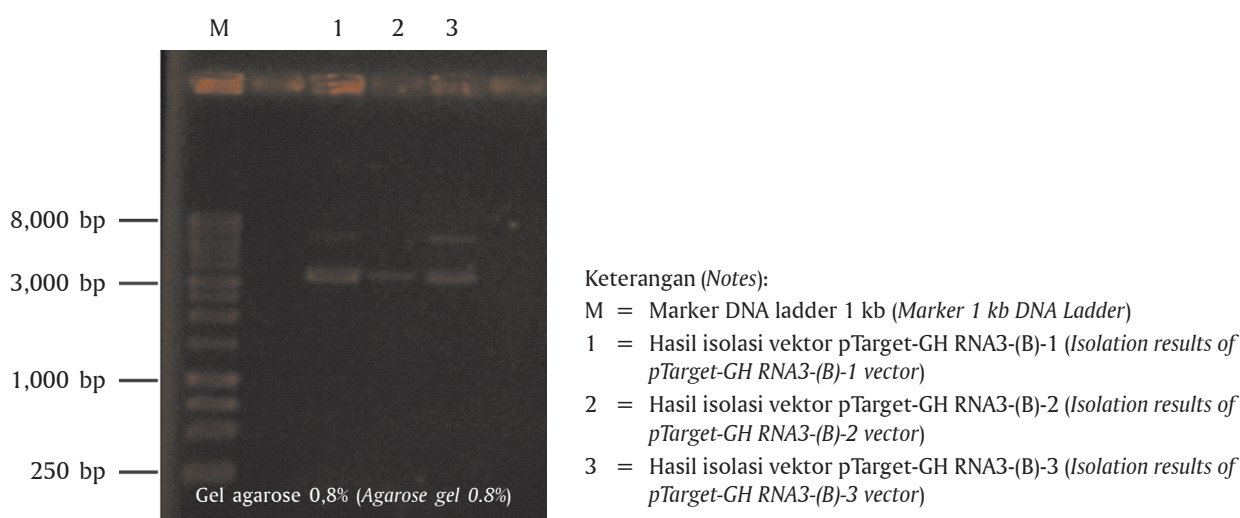
Hasil cek elektroforesis isolasi vektor rekombinan (pTarget-GH RNA3 lele dumbo) yang disajikan pada Gambar 7, terlihat bahwa fragmen DNA vektor rekombinan yang terdeteksi mengalami konfirmasi dalam bentuk DNA *supercoiled* (terdapat dua fragmen DNA pada ukuran di atas 3.000 bp dan fragmen DNA pada ukuran di bawah 8.000 bp). Bentuk DNA tersebut menandakan fragmen DNA vektor rekombinan (pTarget-GH RNA3 lele dumbo) masih melingkar (*circular*) (Alimuddin *et al.*, 2010), dan secara teoritis hasil ini mengindikasikan bahwa klon-klon bakteri *E. coli* strain JM 109 dalam stok gliserol tersebut membawa vek-

tor pTarget yang mengandung sekuen penyandi GH lele dumbo.

Verifikasi keberadaan gen hormon pertumbuhan lele dumbo (GH RNA3 lele dumbo) dalam vektor pTarget yang terkandung di dalam sel kompeten *E. coli* JM 109 dapat dikonfirmasi dengan menggunakan primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R untuk deteksi gen GH lele dumbo. Hasil konfirmasi pTarget yang membawa gen GH tersebut ditunjukkan pada Gambar 8.

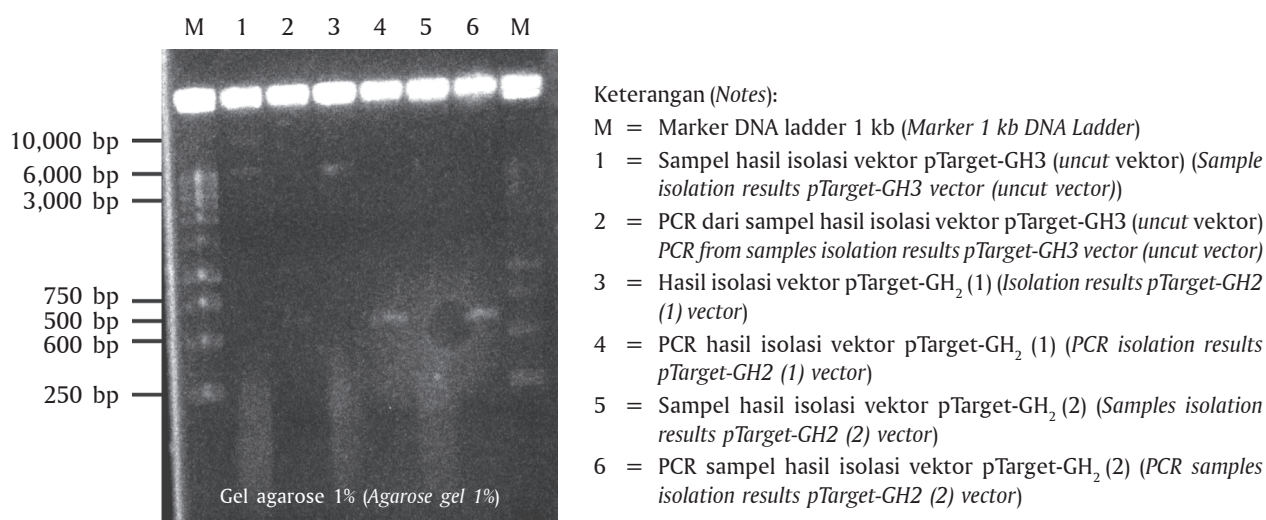
Keberadaan fragmen penyandi GH lele dumbo (sampel GH₂ (1), GH₂ (2), dan *uncut* vektor pTarget) terdeteksi pada Gambar 8 dengan ukuran fragmen sebesar 600 bp, yang menunjukkan bahwa sisipan gen hormon pertumbuhan lele dumbo terdapat dalam vektor pTarget, serta terkandung di dalam sel kompeten *E. coli* JM 109 (stok gliserol). Konstruksi vektor ekspresi untuk pembuatan ikan transgenik ini terdapat dalam klon-klon bakteri dengan kode sampel pTarget-GH₂ (1), pTarget-GH₂ (2) dan pada vektor rekombinan (pTarget-CMV-GH RNA₂) yang tidak dipotong dengan restriksi *EcoRI* (*uncut* vektor). Hasil ini membuktikan bahwa konstruksi vektor ekspresi dengan promoter CMV yaitu pTarget-CMV-GH₂ (1) dan pTarget-CMV-GH₂ (2) untuk pembuatan ikan transgenik telah berhasil dibuat.

Klon-klon dari sampel lain (*aliquot*) yang diverifikasi keberadaan sisipan gen GH lele dumbo dengan primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R juga menunjukkan hasil yang sama dengan sampel hasil isolasi vektor rekombinan pTarget-CMV-GH RNA₂ (1) dan pTarget-CMV-GH RNA₂ (2) sebelumnya. Klon koloni sampel hasil isolasi pTarget-CMV-GH RNA₃ (B₂); pTarget-CMV-GH RNA₃ (B₃); pTarget-CMV-GH RNA₂ (1) dan pTarget-CMV-GH RNA₂ (2) yang membawa sisipan gen hormon pertumbuhan lele dumbo disajikan pada Gambar 9.



Gambar 7. Elektroforegram hasil isolasi pTarget-GH RNA3 lele dumbo

Figure 7. Electrophoregram results isolation pTarget-GH RNA3 African catfish



Gambar 8. Konfirmasi pTarget pembawa GH lele dumbo

Figure 8. Confirmation pTarget carrier African catfish GH

Hasil elektroforegram pada Gambar 9, khususnya sampel hasil isolasi pTarget-GH RNA₃ (B₂), pTarget-GH RNA₃ (B₃) dan pTarget-GH RNA₃ (A₁) terdapat DNA vektor ekspresi (pTarget) pada ukuran sekitar 6.000 bp, sesuai dengan ukuran vektor pTarget (5.670 bp) pada semua sampel tersebut (sumur ke-1, 3, dan 5) (Gambar 9) dalam bentuk DNA linier yang terkandung dalam sel kompeten *E. coli* JM 109 stok gliserol. Konfirmasi ini memberikan keyakinan bahwa vektor ekspresi yang dikloning dan ditransformasikan ke sel kompeten dan disimpan cukup lama dalam gliserol tersebut, memiliki kualitas DNA vektor sangat baik (dalam keadaan utuh), dan konfirmasi sisipan gen hormon pertumbuhan lele dumbo pada masing-masing sampel tersebut terdeteksi dengan ukuran fragmen 600 bp menggunakan primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R (sumur ke-2, 4, dan 6) (Gambar 9).

Sementara, pada sampel hasil kultur cair yaitu: pTarget-GH RNA₂ (1), pTarget-GH RNA₂ (2), dan *uncut* pTarget-GH RNA₃, fragmen DNA vektor sampel tersebut berbentuk *supercoiled* yang mengindikasikan DNA dalam keadaan konfirmasi dengan bentuk melingkar. Bentuk seperti ini umum dijumpai pada fragmen DNA vektor yang baru dikloning ke dalam sel kompeten dan dalam jangka tertentu akan kembali dalam bentuk normal (bentuk sirkular). Indikasi bentuk *supercoiled* ini ditunjukkan dengan munculnya pita-pita ganda di atas 6.000 bp (ukuran vektor pTarget sebesar 5.670 bp) (sumur ke-7, 8, 9, 10, 11, dan ke-12) (Gambar 9). Verifikasi sisipan GH lele dumbo dalam vektor pTarget hasil kultur cair juga diperoleh tepat dengan ukuran fragmen sebesar 600 bp (sumur ke-7, 8, 9, 10, 11, dan ke-12) (Gambar 9). Dengan demikian dalam perakitan konstruksi vektor ekspresi gen hormon pertumbuhan lele dumbo diperoleh stok konstruksi vektor sebanyak enam sampel: (pTarget-CMV-GH RNA₃

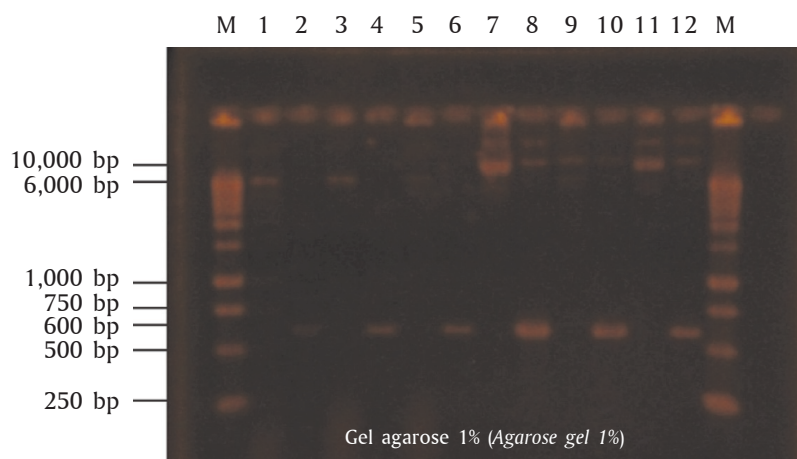
(B₂), pTarget-CMV-GH RNA₃ (B₃), pTarget-CMV-GH RNA₃ (1), pTarget-CMV-GH RNA₂ (1), pTarget-CMV-GH RNA₂ (2), dan *uncut* pTarget-CMV-GH RNA₃).

Digesti pTarget Rekombinan dengan Enzim Restriksi *I-Ppo* I

Untuk mengganti promotor CMV pada vektor ekspresi pTarget-CMV-GH lele dumbo, maka diperlukan pengerjaan pemotongan (*digesti*) tapak *Sgf*-I dan *I-Ppo* I pada vektor pTarget-CMV-GH lele dumbo, sehingga sebagian fragmen promotor CMV dikeluarkan dan promotor tersebut tidak berfungsi kemudian disisipkan dengan fragmen promotor β-aktin lele lokal yang telah diperoleh. Penggantian promotor virus (CMV) dengan β-aktin lele lokal ini dimaksudkan untuk membuat konstruksi vektor ekspresi *all catfish* pada tata konstruksi ikan transgenik, sehingga mudah diterima oleh konsumen ikan sebagai bahan pangan dan elemen *cis-acting* promotor β-aktin lele lokal mudah dikenali oleh faktor *trans-acting* dari ikan sekerabat dibandingkan yang berasal dari virus (Alam *et al.*, 1996; Alimuddin, 2003; Ge *et al.*, 2012).

Hasil produk *digesti* pTarget-CMV-GH lele dumbo dengan enzim restriksi *I-Ppo* I disajikan pada Gambar 10. Berdasar hasil elektroforegram Gambar 10, khususnya untuk sampel pTarget-ORF-GH₂ (2) dan pTarget-ORF-GH₃ (B₂) (sumur ke-1 dan ke-2) (Gambar 10), diperoleh fragmen DNA berukuran sekitar 6.000 bp, yang mengindikasikan ukuran vektor rekombinan (pTarget-CMV-GH lele dumbo) sebesar 6.270 bp, sehingga produk *digesti* dengan enzim *I-Ppo* I pada kedua sampel tersebut terverifikasi dengan benar.

Khusus untuk verifikasi hasil pemotongan fragmen pTarget-CMV-GH lele dumbo dengan *Sgf*-I dan *I-Ppo* I, maka hasil fragmen yang dipotong dapat dilihat pada

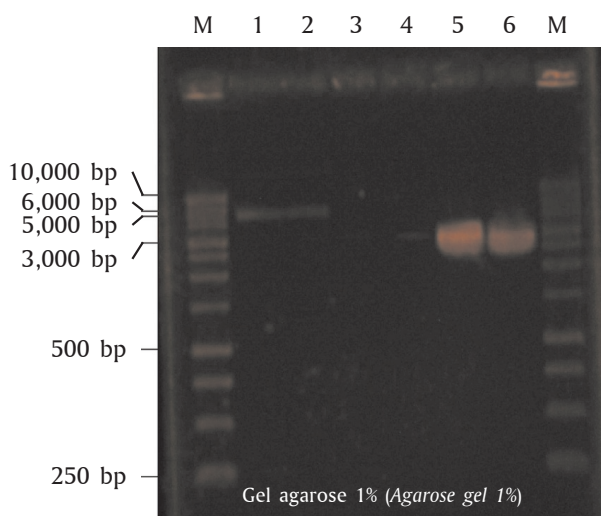


Keterangan (Note):

- M = Marker DNA ladder 1 kb (Marker 1 kb DNA Ladder)
- 1 = Hasil isolasi pTarget-GH₃-(B₂) stok gliserol (Isolation results pTarget-GH3-(B2) of gliserol stock)
- 2 = Konfirmasi PCR hasil isolation pTarget-GH RNA₃-(B₂) stok gliserol pakai primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R
PCR confirmation of isolation results pTarget-GH RNA3-(B2) of gliserol stock use ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers
- 3 = Hasil isolasi pTarget-GH₃-(B₃) stok gliserol (Isolation results pTarget-GH3-(B3) of gliserol stock)
- 4 = Konfirmasi PCR hasil isolasi pTarget-GH RNA₃-(B₃) stok gliserol pakai primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R
PCR confirmation of isolation results pTarget-GH RNA3-(B3) of gliserol stock use ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers
- 5 = Hasil isolasi pTarget-GH₃-(A₁) stok gliserol (Isolation results pTarget-GH3-(A1) of gliserol stock)
- 6 = Konfirmasi PCR hasil isolasi pTarget-GH RNA₃-(A₁) stok gliserol pakai primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R
PCR confirmation of isolation results pTarget-GH RNA3-(A1) of gliserol stock use ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers
- 7 = Uncut pTarget-GH RNA₃ hasil isolasi vektor rekombinan (Isolation results uncut recombinant vector pTarget-GH RNA3)
- 8 = Konfirmasi PCR pTarget-GH RNA₃ hasil isolasi vektor rekombinan (primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R)
PCR confirmation isolation results of recombinant vector pTarget-GH RNA3 (ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers)
- 9 = Hasil isolasi pTarget-GH RNA₂ (1) (Isolation results of pTarget-GH RNA2 (1))
- 10 = Konfirmasi PCR hasil isolasi pTarget-GH RNA₂ (1) dengan primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R
PCR confirmation isolation results of pTarget-GH RNA2 (1) with ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers
- 11 = Hasil isolasi pTarget-GH RNA₂ (2) (Isolation results of pTarget-GH RNA2 (2))
- 12 = Konfirmasi PCR hasil isolasi pTarget-GH RNA₂ (2) dengan primer ORF-Cg-F dan ORF-Cg-R
PCR confirmation isolation results of pTarget-GH RNA2 (2) with ORF-Cg-F and ORF-Cg-R primers

Gambar 9. Konfirmasi sisipan GH lele dumbo pada klon *E. coli* JM 109

Figure 9. Confirmation of African catfish GH inserts in clones of *E. coli* JM 109

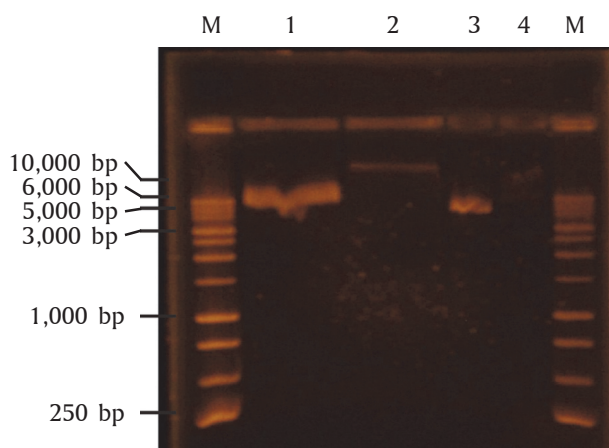


Keterangan (Note):

- M = Marker DNA Ladder 1 kb (Marker 1 kb DNA Ladder)
- 1 = pTarget-ORF GH₂ (2) (pTarget-ORF GH₂ (2))
- 2 = pTarget-ORF GH₃ (B₂) (pTarget-ORF GH₃ (B₂))
- 3 = pTarget-ORF-GH₃-A (1) (pTarget-ORF-GH₃-A (1))
- 4 = pTarget-ORF-GH₃-A (2) (pTarget-ORF-GH₃-A (2))
- 5 = DNA pGEM-T (Kontrol +) (pGEM-T DNA (+ Control))
- 6 = DNA pGEM-T (Kontrol +) (pGEM-T DNA (+ Control))

Gambar 10. Produk *digesti* pTarget-CMV-GH lele dumbo dengan I-Ppo I

Figure 10. Digestion product of pTarget-CMV-GH African catfish with I-Ppo I



Gambar 11. Elektroforegram produk *digesti* vektor rekombinan dengan *Sgf-I*

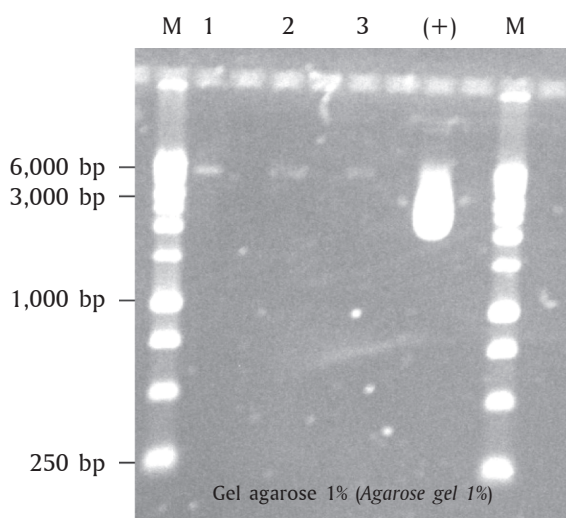
Figure 11. Electrophoregram digestion products of the recombinant vector with *Sgf-I*

Gambar 11. Vektor rekombinan yang hanya dipotong dengan *Sgf-I* pada suhu inkubasi 37°C semalaman (*overnight*) berada pada ukuran sekitar 6.000 bp (sumur ke-1) (Gambar 11), sedangkan pada sumur ke-2 (Gambar 11), ukuran vektor rekombinan yang dipotong *Sgf-I* di atas 6.000 bp, yang mengindikasikan fragmen belum terpotong secara sempurna. Sebaliknya fragmen vektor rekombinan yang dipotong *Sgf-I* pada suhu inkubasi 37°C selama tiga jam (sumur ke-3) (Gambar 11), menunjukkan hasil potongan berkisar 6.000 bp, yang menunjukkan hasil *digesti* yang benar, seperti halnya pada ukuran fragmen yang ditunjukkan pada sumur ke-1 (Gambar 11). Sementara untuk vektor rekombinan pTarget-CMV-GH lele dumbo (ukuran 6.270 bp) yang dipotong oleh enzim *I-Ppo I* dan kemudian dipotong *Sgf-I* (sumur ke-4) (Gambar 11) dengan fragmen yang terpotong sekitar 187 bp menunjukkan ha-

sil yang benar (walaupun bentuk fragmen DNA masih *supercoiled*), dengan ukuran sekitar 6.083 bp (di atas 6.000 bp). Dengan demikian telah diperoleh situs restriksi *Sgf-I* dan *I-Ppo I* pada tapak vektor rekombinan pTarget-GH lele dumbo untuk mengganti (*replacement*) promoter CMV dengan promoter β -aktin lele lokal pada vektor tersebut.

Pada sumur ke-1 (Gambar 11), hasil *digesti* vektor pTarget-GH3B2 menghasilkan fragmen linier berukuran sekitar 6.000 bp setelah dipotong dengan enzim *Sgf-I*, dan selanjutnya gel dari fragmen linier tersebut dipurifikasi menggunakan Wizard PCR clean up kit (Promega) untuk dipotong kembali menggunakan enzim restriksi lain, yaitu *I-Ppo I*, dalam upaya mengganti promoter CMV dengan promoter β -aktin lele lokal pada vektor pTarget. Formula campuran reaksi *digesti* dengan enzim *I-Ppo I* untuk fragmen pTarget-GH3B2 (*Sgf-I*) yaitu: Sterile Deionized Water (SDW) sebanyak 11,5 μ L; buffer RE (*Restriction Enzyme*) 10x sebanyak 2 μ L; BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebanyak 0,5 μ L; DNA vektor (pTarget-GH3B2-*Sgf-I*) sebanyak 5 μ L dan enzim *I-Ppo I* sebanyak 1 μ L. Elektroforesis gel agarose 1% hasil *digesti* vektor ekspresi rekombinan dengan *I-Ppo I* tersebut disajikan dalam Gambar 12.

Berdasarkan ukuran DNA vektor pTarget-GH3B2 sekitar 6.270 bp yang dipotong dengan enzim *Sgf-I* dan *I-Ppo I* (sekuen vektor dibuang sekitar 187 bp), hasil akhir produk *digesti* kedua enzim restriksi yang diperoleh sebesar 6.083 bp. Ukuran fragmen linier produk *digesti* kedua enzim ini terdeteksi pada Gambar 12 (sumur ke-1, 2, dan 3) pada posisi 6.000 bp. Dengan demikian, diperoleh tiga sampel DNA vektor rekombinan, yang telah dipotong sisi restriksinya dengan enzim *Sgf-I* dan *I-Ppo I* untuk insersi sekuen promoter β -aktin lele lokal.



Keterangan (Note):

- M = Marker DNA Ladder 1 kb (*Marker 1 kb DNA Ladder*)
- 1 = pTarget-CMV-GH3B2 dipotong *Sgf-I*, lalu dipotong *I-Ppo I*
pTarget-CMV-GH3B2 cutting with Sgf-I and cutting with I-Ppo I
- 2 = pTarget-CMV-GH3B2 dipotong *Sgf-I*, lalu dipotong *I-Ppo I*
pTarget-CMV-GH3B2 cutting with Sgf-I and cutting with I-Ppo I
- 3 = pTarget-CMV-GH3B2 dipotong *Sgf-I*, lalu dipotong *I-Ppo I*
pTarget-CMV-GH3B2 cutting with Sgf-I and cutting with I-Ppo I
- (+) = Kontrol (+) pGEM-T yang disediakan dari kit *I-Ppo I*
pGEM-T (+) control provided from I-Ppo I kit

Gambar 12. Produk *digesti* vektor rekombinan (pTarget-GH3B2) dengan *Sgf-I* dan *I-Ppo I*

Figure 12. Digestion product of recombinant vector (pTarget-GH3B2) with *Sgf-I* and *I-Ppo I*

Ligasi Vektor Rekombinan (pTarget-GH3B2-Sgf-I-I-Ppo I) dan Promoter β -Aktin Lele Lokal

Produk *digesti* vektor rekombinan dengan enzim *Sgf-I* dan *I-Ppo I* selanjutnya diligasikan dengan sekuen promoter β -aktin lele lokal (pCbBA) untuk menghasilkan konstruksi pTarget-pCbBA-GH3B2 sebagai vektor ekspresi gen hormon pertumbuhan untuk produksi ikan lele lokal transgenik. Rasio vektor rekombinan: promoter β -aktin lele lokal yang digunakan dalam campuran reaksi ligasi tersebut sebesar 1:3. Formula reaksi ligasi sebagai berikut: T4 DNA *ligase* 10x *buffer* sebanyak 1 μ L; pTarget-GH3B2 (*Sgf-I-I-Ppo I*) sebanyak 1 μ L; promoter β -aktin lele lokal (pCbBA) sebanyak 3 μ L; enzim T4 DNA *ligase* sebanyak 1 μ L; dan SDW sebanyak 4 μ L. Selain itu, juga digunakan rasio vektor rekombinan : promoter β -aktin lele lokal sebesar 1:2 dalam reaksi campuran ligasi tersebut.

Tahapan selanjutnya adalah pengerjaan transformasi hasil ligasi di atas ke dalam sel kompeten *E. coli* JM 109, dengan urutan sebagai berikut: mencampurkan 50 μ L sel kompeten dengan 10 μ L setiap sampel, kemudian diinkubasikan ke dalam es curai selama 30 menit. Segera dilakukan *heat shock* setiap sampel pada 42°C dalam *waterbath* selama 90 detik, kemudian diinkubasi kembali dalam es curai selama lima menit. Ditambahkan larutan *SOC Broth* sebanyak 600 μ L ke dalam setiap sampel, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2-3 jam dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *shaker incubator*. Selanjutnya sampel disentrifugasi 14.000 rpm selama satu menit, kemudian diambil produk transforman 100 μ L untuk diresuspensi (menggunakan mikropipet) sehingga menjadi larutan suspensi, kemudian di-*plating* ke cawan petri berisi medium *Luria Broth* (LB)-agar yang sudah disuplementasi dengan *IPTG-X gal-Ampicillin*. Cawan petri tersebut dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruang, dan selanjutnya diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama satu malam (*overnight*). Hasil transformasi tersebut disajikan dalam Gambar 13, koloni putih transforman yang mengandung sekuen konstruksi pTarget-pCbBA-GH3B2.

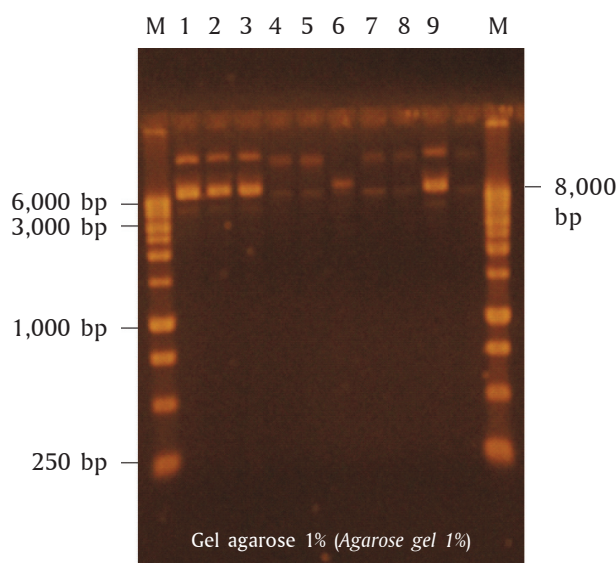
Keberadaan fragmen vektor ekspresi rekombinan (pTarget-pCbBA-GH3B2 berukuran 8.383 bp) terdeteksi dari hasil elektroforesis gel agarose 1% dengan ukuran sekitar 8.000 bp yang terbentuk dari gabungan pTarget-GH3B2 (*Sgf-I-I-Ppo I*) berukuran 6.083 bp, promoter β -aktin lele lokal berukuran 1.700 bp, dan GH3B2 sebesar 600 bp (Gambar 14).

Bentuk fragmen DNA gabungan pTarget-pCbBA-GH lele dumbo (7.783 bp) (Gambar 14); *supercoiled* yang ditampakkan dengan dengan pita ganda DNA dan terindikasi fragmen berukuran 8.000 bp sebagai representasi konstruksi vektor pTarget-promoter β -aktin lele lokal-GH lele dumbo yang mengindikasikan



Gambar 13. Koloni transforman pembawa pTarget yang mengandung promoter β -aktin lele lokal (pCbBA) dan gen hormon pertumbuhan lele dumbo (GH3B2)

Figure 13. *pTarget* carrier transformant colonies containing β -actin promoter walking catfish (pCbBA) and African catfish growth hormone gene (GH3B2)



Keterangan (Note):

M = Marker DNA ladder 1 kb (Marker 1 kb DNA Ladder)

1 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal betina (rasio 1:3)-GH lele dumbo (*aliquot* 1) (*pTarget- β -actin promoter female walking fish (ratio 1:3)- African fish GH (aliquot 1) construction*)

2 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal betina (rasio 1:3)-GH lele dumbo (*aliquot* 2) (*pTarget- β -actin promoter female walking fish (ratio 1:3)-African fish GH (aliquot 2) construction*)

Gambar 14. Konstruksi pTarget-pCbBA-GH lele dumbo (7.783 bp)

Figure 14. *pTarget-pCbBA-African catfish GH (7,783 bp) construction*

Lanjutan keterangan Gambar 14 (Figure 14 note continued):

- 3 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal betina (rasio 1 : 2)-GH lele dumbo (aliquot 1) (*pTarget- β -actin promoter female walking fish (ratio 1 : 2)-African fish GH (aliquot 1) construction*)
- 4 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal betina (rasio 1 : 2)-GH lele dumbo (aliquot 2) (*pTarget- β -actin promoter female walking fish (ratio 1 : 2)-African fish GH (aliquot 2) construction*)
- 5 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal (genom hipofisa-primer pBACS-F dan pBACS-R) (rasio 1 : 3)-GH lele dumbo (aliquot 1) (*pTarget- β -actin promoter walking fish (genomic pituitary-pBACS-F and pBACS-R primers) (ratio 1 : 3)-African fish GH (aliquot 1) construction*)
- 6 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal (genom hipofisa-primer pBACS-F dan pBACS-R) (rasio 1 : 3)-GH lele dumbo (aliquot 2) (*pTarget- β -actin promoter walking fish (genomic pituitary-pBACS-F and pBACS-R primers) (ratio 1 : 3)-African fish GH (aliquot 2) construction*)
- 7 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal (genom hipofisa-primer pBACS-F dan pBACS-R) (rasio 1 : 2)-GH lele dumbo (aliquot 1) (*pTarget- β -actin promoter walking fish (genomic pituitary-pBACS-F and pBACS-R primers) (ratio 1 : 2)-African fish GH (aliquot 1) construction*)
- 8 = Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal (genom hipofisa-primer pBACS-F dan pBACS-R) (rasio 1 : 2)-GH lele dumbo (aliquot 2) (*pTarget- β -actin promoter walking fish (genomic pituitary-pBACS-F and pBACS-R primers) (ratio 1 : 2)-African fish GH (aliquot 2) construction*)
- 9 = Konstruksi pTarget-kontrol insert DNA kit (*pTarget-insert DNA kit control construction*)

keberhasilan ligasi promoter β -aktin lele lokal ke dalam konstruksi pTarget-GH3B2.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa sekuen promoter β -aktin ikan lele lokal (*C. batrachus*) dapat diisolasi dengan ukuran ampikon sekitar 1.700 bp dengan elemen transkripsi CAAT box, TATA box, GC box, motif CArG, dan TGACG. Sisipan (*insert*) gen hormon pertumbuhan lele dumbo dari hasil ligasi pTarget-CMV-GH lele dumbo dan sel kompeten yang mengandung vektor rekombinan dapat dideteksi dengan primer ORF-Cg-GH-F dan ORF-Cg-GH-R. Konstruksi pTarget-promoter β -aktin lele lokal-GH lele dumbo berhasil dibuat.

Saran

Diperlukan deteksi keberadaan sisipan promoter β -aktin lele lokal-GH lele dumbo dalam vektor rekombinan pTarget yang terkandung dalam sel kompeten sebelum digunakan lebih lanjut pada pengerjaan elektroporasi vektor tersebut ke dalam sel sperma lele lokal.

DAFTAR ACUAN

- Alam, M.S., Lavender, F.L., Iyengar, A., Rahman, M.A., Ayad, H.H., Lathe, R., Morley, S.D., & Maclean, N. (1996). Comparison of the activity of carp and rat β -actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 47-122.
- Alimuddin. (2003). *Introduction and expression of foreign $\Delta 6$ -desaturase-like gene in a teleostean fish*. Thesis. Tokyo University of Fisheries, Japan.
- Alimuddin, Nugrahani, W., Aliah, R.S., Sumantadinata, K., Faizal, I., Carman, O., & Yoshizaki, G. (2007). Isolasi dan karakterisasi promoter β -aktin dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 2(2), 199-209.
- Aranburu, A., Liberg, D., Honore, B., & Leandersen, T. (2006). CArG box-binding factor-A interacts with multiple motifs in immunoglobulin promoter and has a regulated sub cellular distribution. *Eur. J. Immunol.*, 36, 2192-2202.
- Argenton, F., Bernardini, S., Puttini, S., & Bortolossi, M. (1991). A TGACG motif mediates growth-hormone factor-1/pituitary-transcriptional-activator-1-dependent cAMP regulation of the rainbow trout growth hormone promoter. *Eur. J. Biochem.*, 238, 591-598.
- Chen, T.T., & Powers, D.A. (1990). Transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 8, 209-215.
- Collares, T., Campos, V.F., Seixas, F.K., Cavalcanti, P.V., Dellagostin, O.A., Moreira, H.L.M., & Deschamps, J.C. (2010). Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. *J. Biosci.*, 35(1), 1-9.
- Dewi, R.R.S.P.S., Alimuddin, Sudradjat, A.O., & Sumantadinata, K. (2010a). Optimal electroporation condition for sperm mediated gene transfer in striped catfish (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Indonesian Aquaculture Journal*, 5(1), 1-10.
- Ge, J., Dong, Z., Li, J., Xu, Z., Song, W., Bao, J., Liang, D., & Li, J. (2012). Isolation of yellow catfish β -actin promoter and generation of transgenic yellow catfish expressing enhanced yellow fluorescent protein. *Transgenic Research*, 21(5), 99-1004.
- Li, L., Chang, M.X., & Nie, P. (2007). Molecular cloning, promoter analysis and induced expression of the complement component C9 gene in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 118, 270-282.
- Muller, F., Zsolt, L., Laszio, V., Lazsio, M., & Laszio, O. (1993). Efficient transient expression system based on square pulse electroporation and *in vivo* luciferase assay of fertilized fish eggs. *Federation of European Biochemical Societies*, 324(1), 27-32.

Santoro, I.M., & Walsh, K. (1991). Natural and synthetic DNA elements with the CArG motif differ in expression and protein-binding properties. *Molecular and Cellular Biology*, 11(12), 6296-6305.

Sin, F.Y.T. (1997). Transgenic fish. *Reviews In Fish Biology And Fisheries*, 7, 417-441.