

## KLONING PROMOTER $\beta$ -AKTIN DARI IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)

Estu Nugroho<sup>\*)</sup>, Alimuddin<sup>\*\*)</sup>, Anang Hari Kristanto<sup>\*)</sup>, dan Odang Carman<sup>\*\*)</sup>

<sup>\*)</sup> Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar  
Jl. Raya Sempur No. 1, Bogor  
E-mail: *estunugro@yahoo.co.uk*

<sup>\*\*)</sup> Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor  
Jl. Lingkar Kampus, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

Naskah diterima: 3 Januari 2009; Diterima publikasi: 2 April 2009

### ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi promotor  $\beta$ -aktin (ggBA) dari ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). Sekuens promotor ggBA diisolasi menggunakan metode "degenerate" PCR. Sekuensing dilakukan menggunakan mesin ABI PRISM 3100-Avant. Analisis sekuens menggunakan program BLAST, GENETYX versi 7 dan TFBind. Panjang sekuens DNA hasil kloning adalah sekitar 2,2 kb. Analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuens DNA hasil kloning memiliki kemiripan dengan sekuens gen  $\beta$ -aktin ikan yang ada di Bank Gen. Sekuens hasil kloning memiliki faktor transkripsi yang konserf untuk promotor  $\beta$ -aktin, yaitu: CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG, dan boks TATA. Posisi faktor transkripsi tersebut juga mirip dengan yang dimiliki oleh promotor  $\beta$ -aktin dari ikan yang ada di Bank Gen. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa fragmen DNA hasil amplifikasi PCR tersebut merupakan sekuens promotor  $\beta$ -aktin ikan gurami.

**KATA KUNCI:** kloning, promotor  $\beta$ -aktin, gurami, degenerate PCR

**ABSTRACT:** *Cloning of  $\beta$ -actin promoter from giant gouramy (Osphronemus gouramy). By: Estu Nugroho, Alimuddin, Anang Hari Kristanto, and Odang Carman*

*The research was aimed to isolate  $\beta$ -actin promoter of gouramy (ggBA). Sequence of ggBA promoter was isolated using "degenerate" PCR. Sequencing was conducted using ABI PRISM 3100-Avant machine. The sequencing analysis was done using BLAST, GENETYX ver 7 and TFBind programs. The sequencing length of DNA clone result was around 2.2 kb. BLAST analysis showed that sequences from cloned DNA had the resemblance to those of  $\beta$ -actin sequences in GenBank database. The cloned sequences had transcript factors which followed  $\beta$ -actin promoter namely CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG and TATA box.*

**KEYWORDS:** *cloning,  $\beta$ -actin promoter, degenerate PCR, transcription factor, Osphronemus gouramy*

### PENDAHULUAN

Promoter merupakan sekuens DNA yang terletak di bagian terminal 5 (*upstream*) yang berfungsi mengatur ekspresi suatu gen. Sekuens regulator ini sangat diperlukan dalam

transgenesis. Umumnya penggunaan promotor yang bukan berasal dari ikan menghasilkan ekspresi transgen yang rendah atau bahkan tidak ada ekspresi (Chourrout *et al.*, 1990). Penggunaan promotor dari ikan telah dibuktikan memiliki aktivitas lebih tinggi

dalam mengatur ekspresi transgen dibandingkan dengan yang berasal dari mamalia atau virus pada ikan transgenik (Alam *et al.*, 1996; Hanley *et al.*, 1998; Alimuddin, 2003).

Salah satu jenis promoter yang memiliki aktivitas tinggi pada otot dan selalu aktif adalah promoter  $\beta$ -aktin. Promoter  $\beta$ -aktin telah diisolasi dari beberapa jenis ikan dan dilaporkan sebagai regulator dengan aktivitas tinggi dalam mengatur ekspresi transgen pada ikan transgenik. Promoter  $\beta$ -aktin telah diisolasi dari ikan mas *Cyprinus carpio* (Liu *et al.*, 1990), ikan medaka *Oryzias latipes* (Takagi *et al.*, 1994), ikan zebra *Danio rerio* (Higashijima *et al.*, 1997), ikan mud loach *Misgurnus mizolepis* (Noh *et al.*, 2003), ikan nila (Hwang *et al.*, 2003; Anna, 2008), dan ikan kerapu tikus (Alimuddin *et al.*, 2007). Promoter  $\beta$ -aktin dari ikan medaka mampu mengatur ekspresi gen penanda *LacZ* pada embrio ikan medaka (Takagi *et al.*, 1994). Ekspresi gen GFP yang kuat dengan menggunakan promoter  $\beta$ -aktin medaka juga telah ditunjukkan pada ikan medaka (Hamada *et al.*, 1998) dan rainbow trout (Yoshizaki, 2001). Selanjutnya, promoter ini juga aktif mengatur ekspresi gen pengkode enzim D6-desaturase pada ikan zebra (Alimuddin *et al.*, 2005) dan gen pengkode hormon pertumbuhan pada ikan nila (Kobayashi *et al.*, 2007). Promoter  $\beta$ -aktin ikan mas mampu mengatur ekspresi beberapa gen penanda pada beberapa jenis ikan (Liu *et al.*, 1990; Moav *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 2003). Sementara itu, promoter  $\beta$ -aktin dari ikan zebra dilaporkan aktif mengatur ekspresi gen GFP pada ikan zebra (Higashijima *et al.*, 1997).

Panjang sekuens dan elemen yang ada pada promoter sangat menentukan tingkat aktivitasnya. Walaupun promoter  $\beta$ -aktin dari suatu spesies mampu mengatur ekspresi gen asing pada beberapa spesies lain, hingga saat ini belum diketahui promoter  $\beta$ -aktin dari jenis ikan mana yang lebih baik karena panjang sekuens dan elemen yang digunakan oleh setiap peneliti berbeda-beda. Hwang *et al.* (2003) baru-baru ini mencoba untuk membandingkan aktivitas promoter  $\beta$ -aktin dari ikan nila dan ikan mas. Panjang sekuens promoter (1,5 kb untuk ikan mas dan 1,6 kb pada ikan nila) dan elemen yang digunakan relatif sama; keduanya memiliki elemen CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau disebut motif CAR<sub>6</sub>G, dan boks TATA. Uji aktivitas promoter dengan gen penanda *LacZ* menunjukkan bahwa promoter  $\beta$ -aktin

ikan nila (famili Cichlidae) lebih baik daripada ikan mas (famili Cyprinidae) bila digunakan pada ikan nila, tetapi hasil sebaliknya diperoleh bila digunakan pada ikan zebra (famili Cyprinidae). Hasil penelitian Hwang dan koleganya memperkuat dugaan bahwa penggunaan promoter dari spesies yang sama atau dari yang sekerabat adalah lebih baik. Pada artikel ini kami melaporkan hasil kloning promoter  $\beta$ -aktin dari ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dalam rangka pembuatan konstruksi gen *all-gurami* untuk pembuatan ikan gurami transgenik. Konstruksi gen dengan promoter dan gen penyandi protein tertentu dari ikan gurami disebut sebagai konstruksi gen *all-gurami*. Penerimaan konsumen diduga akan lebih baik pada ikan transgenik yang dibuat menggunakan konstruksi gen dengan promoter dan gen dari ikan, khususnya yang berasal dari spesies yang sama dibandingkan dengan yang berasal dari mamalia atau virus (Maclean & Laight, 2000). Selain itu, penggunaan konstruksi gen *all-gurami* diduga dapat menjaga biodiversitas plasma nutfah bila terjadi pemijahan dengan populasi alam.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi DNA Genomik dan Amplifikasi PCR

DNA genomik diekstraksi dari jaringan hati ikan gurami menggunakan kit isolasi DNA Puregene (Gentra, Minneapolis, USA) dengan prosedur yang ada. Sekuens promoter  $\beta$ -aktin ikan gurami, disingkat menjadi ggBA, diisolasi menggunakan metode "degenerate" PCR dengan primer yang didesain berdasarkan database di Bank Gen seperti yang telah dijelaskan dalam Alimuddin *et al.* (2007). Primer yang digunakan adalah forward "F-BA" (5'-GTGAGTGACGCCGAC-CAATC-3') dan reverse "R-BA" (5'-TAGAAGGTGTGRTGCCAGATCTTC-3'). Amplifikasi PCR menggunakan LA *Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) dengan program, yaitu pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit; 5 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik dan 62°C selama 3 menit; 30 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, 58°C selama 30 detik dan 72°C selama 3 menit; serta 1 siklus pada suhu 72°C selama 3 menit. Pengecekan hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR diisolasi dari gel menggunakan kit purifikasi DNA (MoBio Laboratories, CA, USA) sesuai prosedur yang ada.

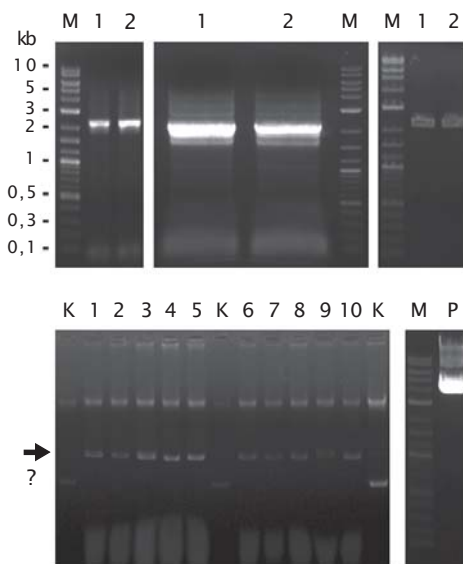
### Ligasi Fragmen DNA, Transformasi dan Seleksi Koloni Bakteri

Fragmen DNA hasil purifikasi dari gel diligasi dengan vektor kloning pGEM-T Easy (Promega, WI, USA) seperti yang dijelaskan sebelumnya dalam Alimuddin *et al.* (2007). Plasmid DNA hasil ligasi disebut sebagai pT-ggBA. Transformasi plasmid pT-ggBA ke dalam sel kompeten *E. coli* DH-5a dilakukan menggunakan kejutan panas pada suhu 42°C selama 45 detik. Bakteri hasil transformasi dipulihkan dalam media SOC dan dikultur selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, bakteri disebar dalam cawan Petri yang mengandung gel agarosa 2xYT dan diinkubasi selama semalam. Koloni bakteri yang membawa plasmid pT-ggBA diseleksi menggunakan metode "cracking" seperti dijelaskan dalam Alimuddin *et al.* (2007). Koloni bakteri yang membawa plasmid pT-ggBA dikultur menggunakan media cair 2xYT selama

semalam untuk digunakan dalam isolasi plasmid.

### Isolasi Plasmid, Sekuensing, dan Analisis Sekuens Promoter $\beta$ -aktin

Isolasi plasmid dilakukan menggunakan kit FlexiPrep (Amersham Biosciences, NJ, USA) dengan prosedur yang ada. Amplifikasi PCR untuk sekuensing plasmid pT-ggBA dilakukan menggunakan sistem BigDye dengan primer "T7-BS" (5'-TTGTAATACGACTACTATAGGGCGAA-3') atau DyeT-R (5'-GGAATTGTGAGCGGATAACA-3'). Program PCR yang digunakan yaitu pre-denaturasi pada suhu 96°C selama 2 menit, dan 30 siklus dengan suhu 96°C selama 10 detik, 55°C selama 5 detik dan 60°C selama 3 menit. Sekuensing DNA dilakukan menggunakan mesin ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer. Analisis sekuens menggunakan software BLAST, GENETYX versi 7 dan TFBind.



Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi PCR (gambar atas-kiri dan tengah) dan hasil purifikasi DNA dari gel (gambar atas-kanan). 1 dan 2 adalah nomor sampel. M adalah marker DNA 2-log ladder 0,1-10,0 kb (BioLabs Inc., New England). Elektroforesis hasil *cracking* (gambar bawah-kiri) dan plasmid pT-ggBA (gambar bawah-kanan). 1-10 merupakan nomor koloni bakteri putih yang membawa insersi (tanda panah); K adalah koloni biru tanpa insersi sebagai kontrol (tanda kepala panah); dan P adalah plasmid pT-ggBA.

Figure 1. Electrophoresis of PCR amplification product (left-above and middle) and DNA purification result from the gel (right-above). 1 and 2 are sample numbers. M was 2-log ladder DNA marker, 0.1 - 10.0 kb (BioLabs Inc. New England). Electrophoresis of the *cracking* product (left-bottom) and pT-ggBA(right-bottom). The number of the inserted carried bacteria (arrow sign) was 1 to 10, K was the blue colony without insertion and P was pT-ggBA

## HASIL DAN BAHASAN

Panjang fragmen DNA ikan gurami hasil amplifikasi PCR menggunakan primer F-BA dan RBA adalah sekitar 2 kb (Gambar 1, atas-kiri). Fragmen DNA hasil purifikasi dari gel (Gambar 1, atas-kanan) diligasi dengan vektor kloning, ditransformasi ke sel kompeten *E. coli* dan kemudian bakteri dikultur. Dengan melakukan elektroforesis terhadap hasil *cracking* untuk bakteri koloni berwarna putih, diketahui bahwa semua koloni bakteri tersebut membawa DNA insersi yang ditandai dengan ukuran pita DNA hasil elektroforesis lebih besar dibandingkan dengan kontrol koloni biru "K" (Gambar 1, bawah-kiri). Sejalan dengan hasil *cracking*,

ukuran pita plasmid DNA hasil isolasi dari bakteri koloni putih lebih besar (Gambar 1, bawah-kanan) dibandingkan dengan ukuran vektor kloning pGEM-T Easy (3015 bp). Hal ini menunjukkan bahwa plasmid DNA bakteri tersebut mengandung DNA insersi hasil amplifikasi PCR.

Hasil sekuensing terhadap DNA insersi tersebut ditunjukkan pada Gambar 2 dan 3. Panjang sekuens hasil sekuensing dari arah *forward* adalah 1.262 bp (Gambar 2), sementara dari arah *reverse* adalah 1.202 bp (Gambar 3). Bagian ujung sekuens dari kedua hasil sekuensing tersebut yang memiliki kesamaan yang tinggi adalah sepanjang 248 bp.

5' -

```
gtgagtga cgccggaccaatc agcggggcgcgattccgaaagttaacctttatggctcga
gccgggcatctgacgcggtataaaagacgagcgcccacagctaacggaTTCACCTCTGAGC
GCCGTCACACGCAGCTTGTGCGGAATATCATTTGCCTGAAACCGGTTCCCTTAAAGCGAA
AAACCCCCCCCCACCAAGgtaaaggcactggaactagtactgaaaatttctaatcttag
agcaatatttaataagtaataatggcttgtgtgtttttaatgcaactgactgttaa
gtgtcattttgat tggaaaaagacg tgagtgacca cgaggttctttgtctggccataca
ccaa taatt taac ttaaagctt ttaaaaatc tataa ttaa aattgatac tactat ttgta
ttttgcggg tatt ttg taagagtgtgcagt aatga tgac tagagaccgcaaaacttgg
acac aggtgcctt tggatggagccggcttaa tgaat aacgggtccc tcta agt taatt
tcta cttaaactggctcgtccttggtgggtgtgcagatttgttcagcttcagctccgg
ccctgtgtgcctt tta tcccagcagagtag ttttaaagcggctt tcgagttgagattgt
ctggattccggctcttc tccct ttgtgcgcc cgatg cggcgggggtgtgacctacttagc
atat tagct tagc caca tcatg ctaacaccg ccctt caga cttgcaacc aagcaattt
attaataat tata tttt taatt aacagccatgttca cttactggg cgtggtaa cgctcac
atta tcatc tgaataac taact gtaaggctt cctttaaaggact tgcgcatagaggcct
gcaaaaaagcaca aatgaataattgtctaa ttgagtcgt tggacgggttttctacatg
atgactccacgct ttgtcaacttgctgagga aaaggggga aactgcacatcaccacttc
ttaggaaaggcgtgctt tcagaaatgaagcactcagtcaggaactgtgacccattcatga
gtcaacacagttcattatgca cttat ttc cctctctgttaattaaaagccagcagtggt
gcag ttaaagctggtgcaggagcttt tggaaactgaacttacacggtgactttgtagt
ctgg tggaggagc cgctgtgca tgaatgggtgtcagggatgacgc aatgttttggggca
aa- ' 3
```

Gambar 2. Sekuens genomik  $\beta$ -aktin ikan gurami hasil sekuensing dari arah depan. Huruf kecil adalah intron, sementara huruf besar adalah ekson 1. Huruf kecil yang ditulis tebal dalam kotak merupakan primer *forward*. Huruf kecil digarisbawahi merupakan elemen konserf CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG dan boks TATA boks

Figure 2. Genomic sequence of gouramy  $\beta$ -actin from forward direction. Lowercase letters are intron, while the uppercase are exon. The lowercases, inside the box and written in bold are forward primer. The underlined lowercases are CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG dan TATA box elements

5' -  
actgcacatcaccactcctagaaagcgtgcttcagaatgagcatcagtcagac  
ttgtgacca tcatgagt cacac agtca tatg cacta t tcc ctctt ctgtataaa  
agccagcagtggtcagttaaaggctgg tgcaggagc tttt gaaac t gaa actta  
caacgtgtagacttgtagtcgtgtgtgaggagccgc tgtg caatgaaatggcgtg  
gtcaggatgacgcagtgatagaggc aaagacgtc ttatgcagattaaacct a  
caaaattgctcaagaatgaggtggcagagggggaagctggctgca gtagcctg  
gaggaagcggctgctcagcggc cggcttgataaacgccttcctcgtcgtcgtctg  
ccgc tctggcctgcgcc atggc gccgg tagc cgcaa agctgctcaaaac cgaac  
catgt tccttatatggtaacaacagaacgcagcgcca cttcctttgtctgctcg  
ggcggaatgtgggtcca cagcgcacc gagcggctcctctggtagactgcaggc  
gactgagtc aacaggaagtgaggctcggagtgtcgtggcggatgtgagacttg  
agtat tcaa cgcttctc tctt taact ttct ctcttaacagTACAACCATGGAT  
GATGAAATCGCCGCACTCGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGA  
TTCCGCGGTGACGACGCCCCCCGTGCTGTCTTCCCTCCATCGTCGGTCGCCCC  
AGGCATCAGgtgagtga cggat cttaa ttagaatga acac aaact cctgactgg  
ctaa ctaga acttgaat acaca atatt taca agtat tgaagtaat tcttaattt  
tata agctc cagtgat ataca tcgat tatg taatt acaggggag ctgt tagtg  
tttt tattaatgc ataa atta agtgc atgt aagca catt t cact ggat agttt  
agaaacactgacatgtgcctatgtttaatactcaaatta gtttggcagtgctc  
tcac cttaa gttc tcca attt gttcagGGAGTGATGGTGGGTATGGCCAGAAG  
GACAGCTACGTTGGTGA TGAAGCTCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACTCTGAAG  
TACCCATCGAGCACGGTATTGTGATCAACTGGGATGACATGGAG **GAAGATCGGC**  
**ACCACACCTTCTA** - 3'

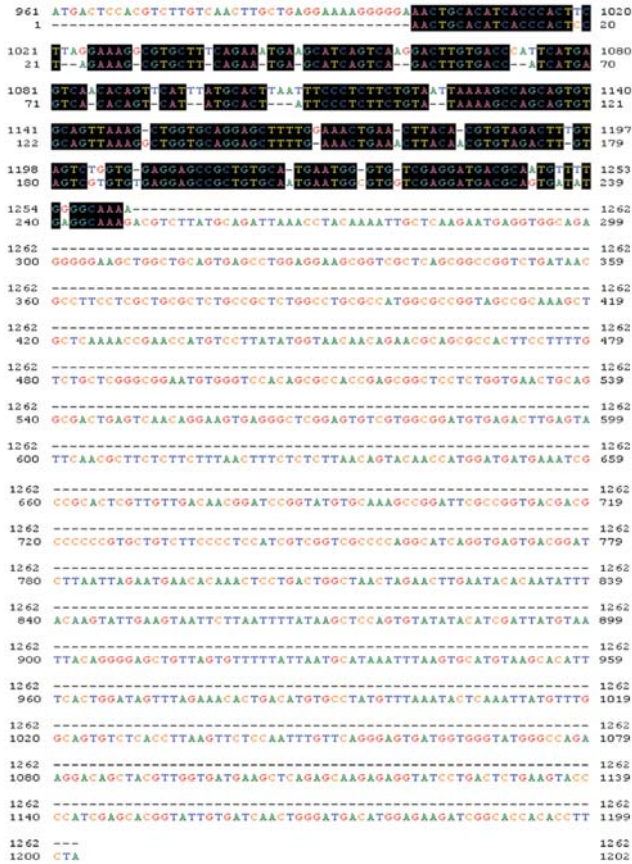
Gambar 3. Sekuens genomik  $\beta$ -aktin ikan gurami hasil sekuensing dari arah *reverse*. Huruf kecil adalah intron, sementara huruf besar adalah ekson 2 dan 3. Kodon awal ATG (ditulis tebal) terletak pada epon 2. Huruf besar ditulis tebal dalam kotak merupakan primer *reverse*. Huruf kecil digaris bawah merupakan elemen CC(A/T)<sub>6</sub>GG

Figure 3. Sequence of gouramy  $\beta$ -actin genomic from reverse direction. Lowercase letters are intron, while the uppercases are exon 2 and 3. Initial codon ATG (written in bold) located on exon 2, The uppercases, inside the box and written in bold are reverse primer. The underline lowercases are CC(A/T)<sub>6</sub>GG elements

Meskipun perlu sub-kloning untuk mengetahui secara pasti, berdasarkan *alignment* antara sekuens arah *forward* dan *reverse*, panjang sekuens hasil kloning adalah sekitar 2,2 kb (Gambar 4), mirip dengan panjang fragmen DNA hasil amplifikasi PCR (Gambar 1, atas-kiri). Panjang sekuens hasil sekuensing dari arah *forward* disajikan pada Gambar 2. dan dari arah *reverse* disajikan pada Gambar 3.

*Alignment* antara sekuens arah *forward* dan *reverse*, panjang sekuens hasil kloning disajikan pada Gambar 4.

Untuk mengetahui apakah sekuens yang diperoleh mirip dengan suatu gen atau genom yang ada di Bank Gen, dilakukan analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil analisis menunjukkan bahwa sekuens tersebut sangat mirip dengan gen  $\beta$ -aktin dari berbagai jenis ikan seperti ikan nila dan ikan mas (hasil tidak ditampilkan). Dengan menggunakan program TFBind, diketahui bahwa sekuens hasil kloning memiliki sekuens konserf (*conserve sequence*) bagi promoter  $\beta$ -aktin, yaitu CCAAT dan boks TATA (Gambar 5). Hasil



Gambar 4. Alignment sekuens DNA genomik β-aktin ikan gurami hasil sekuensing dari arah *forward* (atas) dan *reverse* (bawah). Bagian ujung masing-masing sekuens *forward* (ujung 3') dan *reverse* (ujung 5') memiliki persamaan yang cukup tinggi. Panjang sekuens hasil amplifikasi PCR mirip dengan panjang sekuens hasil sekuensing, yaitu 2,2 kb. Panjang sekuens arah *forward* 1.262 kb, arah *reverse* 1.202 kb, dan bagian sekuens yang sama sepanjang 248 bp

Figure 4. Sequence alignment of gouramy DNA of β-actin genomic from forward direction (above) and reverse (bottom). Each tail part of forward sequence (3' tail) and (5' tail) have the highest similarity. The sequence of PCR amplification length is similar to the sequence length of the sequencing result which is 2.2 kb. The sequence length from forward direction is 1,262 kb, reverse direction 1,202 kb and the similar sequence part 248 bp

analisis sekuens dengan menggunakan program TFBind disajikan dalam Gambar 5.

Posisi sekuens konserf tersebut adalah mirip dengan yang ada di dalam sekuens promoter β-aktin ikan-ikan yang ada di Bank Gen. Selain itu, dengan membandingkan sekuens hasil sekuensing dengan sekuens promoter β-aktin beberapa jenis ikan yang ada di database menggunakan program GENETYX, diketahui bahwa sekuens hasil kloning juga

memiliki sekuens konserf CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau CArG (Gambar 2 dan 3). Sekuens promoter β-aktin ikan gurami memiliki 2 sekuens CArG dengan posisi seperti promoter β-aktin ikan pada umumnya, yaitu terletak antara faktor transkripsi CCAAT dan boks TATA, dan dalam intron 1 dekat sekuens ekson 2. Posisi sekuens CArG adalah seperti yang terdapat pada promoter β-aktin dari ikan lainnya (Noh *et al.*, 2003), manusia, tikus dan ayam (Orita *et*

| AC     | ID         | Skor     | Posisi | Arah | Konsensus      | Sekuens hasil kloning |
|--------|------------|----------|--------|------|----------------|-----------------------|
| M00254 | V\$CAAT_01 | 0.935329 | 11     | (+)  | NNNRRCCAATSA   | CCGGACCAATCA          |
| M00252 | V\$TATA_01 | 0.965998 | 78     | (+)  | STATAAAWRNNNNN | GTATAAAAGACGAGC       |

Gambar 5. Hasil analisis TFBind. Sekuens hasil kloning memiliki skor kemiripan dengan sekuens konsensus masing-masing sebesar 93,5% dan 96,6% untuk CCAAT dan boks TATA

Figure 5. TFBind analysis result. Cloning result sequence has similarity score with each consensus sequence of 93.5 % and 96.6 % for CCAAT and TATA box

al., 1989; Sands et al., 1993). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sekuens promotor  $\beta$ -aktin ikan gurami adalah konserf secara evolusi (*evolutionary conserved*). Satu sekuens tambahan yang mirip CARg juga terdapat dalam intron 1, yaitu CCTTTAAATGG.

Perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui apakah sekuens tersebut juga

menentukan tingkat aktivitas promotor  $\beta$ -aktin ikan gurami. nSekuens DNA hasil kloning memiliki 3 ekson (Gambar 2 dan 3). Posisi ekson-intron dalam sekuens mengikuti aturan GT-AG. Posisi ekson diduga menggunakan program GENETYX. Ekson 1 diduga terletak pada nukleotida (nt.) 109-198 dihitung dari ujung sekuens terminal 5 hasil

```

[GENETYX      : Translation of Nucleotides into Amino Acids]
Date          : 2008.06.29
Filename      : beta-actin ikan gurami
Sequence Size : 352
Genetic Code  : The Standard Code

      10          20          30          40          50          60
ttcactctgagcgcgctcacacgcagcttgtgcggaatatcatttgcctgaaaccggttc
      70          80          90         100         110         120
ccttaaaagcgaatacccccccccaagtaaccATGGATGATGAAATCGCCGCACT
                                   M D D E I A A L

      130         140         150         160         170         180
CGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAGCCGGATTCGCCGGTGACGACGCCCCCG
V V D N G S G M C K A G F A G D D A P R

      190         200         210         220         230         240
TGCTGTCTTCCCTCCATCGTTCGGTCGCCCCAGGCATCAGGAGTGATGGTGGGTATGG
A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G

      250         260         270         280         290         300
CCAGAAGGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCTCAGAGCAAGAGGATATCCTGACTTGAA
Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T L K

      310         320         330         340         350         360
GTACCCCATCGAGCAGGTATTGTGATCAACTGGGATGACATGGAGAAGATC
Y P I E H G I V I N W D D M E K I

Gurami 1  MDDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVNVGHGQKDSYVGDEAQS 60
Mas      1  MDDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVNVGHGQKDSYVGDEAQS 60
Medaka  1  MDDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVNVGHGQKDSYVGDEAQS 60
Nila    1  MDDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVNVGHGQKDSYVGDEAQS 60

Gurami 61  KRGILTLKYPYIEHGIVTNWDDMEKI 85
Mas      61  KRGILTLKYPYIEHGIVTNWDDMEKI 85
Medaka  61  KRGILTLKYPYIEHGIVTNWDDMEKI 85
Nila    61  KRGILTLKYPYIEHGIVTNWDDMEKI 85
    
```

Gambar 6. Sekuens parsial gen  $\beta$ -aktin ikan gurami dan asam amino residu (gambar atas). Alignment asam amino residu gen  $\beta$ -aktin ikan gurami dengan ikan mas, medaka, dan ikan nila. Nomor akses Bank Gen b-aktin ikan mas M24113, ikan medaka S74868 dan ikan nila AY116536

Figure 6. Partial sequence of gouramy  $\beta$ -actin gen and amino acid residue (above). Alignment of amino acid of gouramy  $\beta$ -actin gen with common carp, medaka and nile tilapia. GenBank accession number of common carp is M24113, medaka S74868 and nile tilapia AY116536

sekuens arah *forward* (Gambar 2). Ekson 2 terletak pada nt. 636-765, sementara sekuens parsial (sebagian) ekson 3 dimulai pada nt. 1.054 dihitung dari ujung sekuens terminal 5 arah *reverse* (Gambar 3). Ekson 1 merupakan sekuens tidak mengkodekan asam amino atau disebut *untranslated region*. Posisi dan sekuensnya masih bersifat dugaan dan perlu dibuktikan dengan cara mengisolasi mRNA  $\beta$ -aktin. Selanjutnya, ekson 2 dan 3 merupakan sekuens yang mengkodekan asam amino. Kodon awal (ATG) terdapat pada ekson 2. Sekuens asam amino residu gen  $\beta$ -aktin ikan gurami (Gambar 6) memiliki kemiripan yang sangat tinggi dibandingkan dengan ikan mas, medaka dan ikan nila. Hal ini memperkuat dugaan bahwa sekuens DNA hasil isolasi merupakan sekuens  $\beta$ -aktin.

Sekuens promotor  $\beta$ -aktin ikan gurami hasil kloning memiliki faktor-faktor transkripsi spesifik yang biasa ditemukan pada promotor  $\beta$ -aktin ikan, yaitu CCAAT, CC(A/T)<sub>6</sub>GG atau motif CAR<sub>G</sub>, dan boks TATA. Dengan demikian sekuens hasil kloning diduga memiliki aktivitas yang sama dengan promotor  $\beta$ -aktin ikan yang telah diuji sebelumnya seperti ikan medaka. Hubungan tingkat aktivitas promotor  $\beta$ -aktin dengan sekuens CCAAT telah diteliti oleh Quitschke *et al.* (1989). Kegunaan motif CAR<sub>G</sub>, sebagai elemen responsif terhadap serum (*serum-response element*) telah dijelaskan oleh Liu *et al.* (1991). Elemen CAR<sub>G</sub> kedua juga berpengaruh positif terhadap aktivitas promotor (Liu *et al.*, 1990). Boks TATA merupakan elemen yang umum dijumpai pada sekuens promotor, sebagai tempat RNA polimerase melekat (*bind*) pada saat transkripsi RNA akan berlangsung (Glick & Pasternak, 2003).

## KESIMPULAN

Promotor  $\beta$ -aktin dari ikan gurami telah berhasil diisolasi dengan panjang sekuens sekitar 2,2 kb. Elemen-elemen yang biasa terdapat pada promotor  $\beta$ -aktin, yaitu CCAAT, CAR<sub>G</sub> dan boks TATA, juga ditemukan pada sekuens promotor  $\beta$ -aktin ikan gurami hasil kloning.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini biaya oleh Anggaran APBN Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar 2008. Kami menyampaikan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Goro Yoshizaki (Laboratorium Fisiologi Ikan, Department of Marine

Biosciences, Tokyo University of Marine Sciences and Technology, Japan) atas bantuannya dalam sekuensing.

## 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  $\beta$ -actin gene regulatory sequences in tilapia and rainbow trout embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 45: 117-122.
- Alimuddin. 2003. *Introduction and expression of foreign D6-desaturase-like gene in a teleostean fish*. Thesis. Tokyo University of Fisheries, Japan.
- Alimuddin, Yoshizaki, G., Kiron, V., Satoh, S., & Takeuchi, T. 2005. Enhancement of EPA and DHA biosynthesis by over-expression of masu salmon D6-desaturase-like gene in zebrafish. *Transgenic Res.*, 14: 159-165.
- Alimuddin, Nugrahani, W., Aliah, R.S., Sumantadinata, K., Faizal, I., Carman, O., & Yoshizaki, G. 2007. Isolasi dan karakterisasi promotor  $\beta$ -aktin dari ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*). *J. Ris. Akuakultur*, 2: 199-210.
- Anna, O. 2008. *Isolasi dan karakterisasi promotor  $\beta$ -aktin ikan nila (*Oreochromis niloticus*)*. Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. FPIK, IPB.
- Chourrout, D.R., Guyomard, R., & Houdebine, L.M. 1990. Techniques for the development of transgenic fish: a review. In: Church RB (Ed.). *Transgenic Models in Medicine and Agriculture*. Wiley-Liss, New York, p. 89-99.
- Glick, B.R. and Pasternak, V. 2003. *Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA*. 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
- Hamada, K., Tamaki, K., Sasado, T., Watai, Y., Kani, S., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Kinoshita, M., Kohno, R., Takagi, S., & Kimura, M. 1998. Usefulness of the medaka  $\beta$ -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7: 173-180.
- Hanley, S., Smith, T.J., Muller, F., Maclean, N., Uzbekova, S., Prunet, P., & Brenton, B. 1998. Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7: 165-172.



- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., & Eguchi, G. 1997. High frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.*, 192: 289-299.
- Hwang, G.L., Rahman, M.A., Razak, S.A., Sohm, F., Farahmand, H., Smith, A., Brooks, C., & Maclean, N. 2003. Isolation and characterisation of tilapia  $\beta$ -actin promoter and comparison of its activity with carp  $\beta$ -actin promoter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1,625: 11-18.
- Kobayashi, S.I., Alimuddin, Morita, T., Miwa, M., Lu, J., Endo, M., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270: 427-435.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., & Hackett, P.B. 1990. Functional analysis of elements affecting expression of the  $\beta$ -actin gene of carp. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3,432-3,440.
- Liu, Z., Moav, B., Faras, A.J., Guise, K.S., Kapuscinski, A.R., & Hackett, P. 1991. Importance of the CArG box in regulation of  $\beta$ -actin-encoding genes. *Gene*, 108: 211-217.
- Maclean, N. & Laight, R.J. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish Fish*, 1: 146-172.
- Moav, B., Liu, Z., Caldovic, L.D., Gross, M.L., Faras, A.J., & Hackett, P.B. 1993. Regulation of expression of transgenes in developing fish. *Transgenic Res.*, 2: 153-161.
- Noh, J.K., Cho, K.N., Han, E.H., Kim, A., Lee, J.S., Kim, D.S., & Kim, C.G. 2003. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) beta-actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis. *Mar. Biotechnol.*, 5(3): 244-252.
- Orita, S., Makino, K., Kawamoto, T., Niwa, H., Sugiyama, H., & Kakunaga, T. 1989. Identification of a site that mediates transcriptional response of the human  $\beta$ -actin gene to serum factors. *Gene*, 30: 13-19.
- Quitschke, W.W., Lin, Z.Y., DePoti-Zilli, L., & Pater-son, B.M. 1989. The  $\beta$ -actin promoter. *J. Biol. Chem.*, 264: 9,539-9,546.
- Rahman, M.A. & Maclean, N. 1992. Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1: 286-289.
- Sands, A.T., Hansen, T.N., Demayo, F.J., Stanley, L.A., Xin, L., & Schwartz, R.J. 1993. Cytoplasmic  $\beta$ -actin promoter produces germ cell and preimplantation embryonic transgene expression. *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 117-126.
- Takagi, S., Sasado, T., Tamiya, G., Ozato, K., Wakamatsu, Y., Takeshita, A., & Kimura, M. 1994. An efficient expression vector for transgenic medaka construction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 192-199.
- Yoshizaki, G. 2001. Gene transfer in salmonidae: applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49: 137-142.