

KLONING cDNA HORMON PERTUMBUHAN DARI IKAN GURAME (*Osphronemus gouramy*)

Estu Nugroho^{*)}, Alimuddin^{**)}, Anang Hari Kristanto^{*)}, Odang Carman^{*)},
Novi Megawati^{*)}, dan Komar Sumantadinata^{*)}

ABSTRAK

Penelitian mengenai kloning cDNA pengkode hormon pertumbuhan ikan gurame telah dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh sekuens DNA komplemen hormon pertumbuhan sebagai langkah awal dalam rangka pengembangan teknologi rekayasa genetik ikan gurame. Empat buah kelenjar hipofisa ikan gurame digunakan sebagai bahan bakunya dan dilakukan proses ekstraksi RNA total dari kelenjar hipofisa, dilanjutkan dengan sintesis cDNA, amplifikasi PCR, purifikasi fragmen DNA dari gel, ligasi produk PCR dengan vektor kloning, transformasi dan inkubasi bakteri, seleksi koloni bakteri putih, isolasi plasmid, dan sekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa panjang produk amplifikasi PCR adalah 843 bp yang menyandikan 204 asam amino residu dan mengandung sekuens-sekuens yang konserf untuk gen hormon pertumbuhan (GH). Analisis homologi menunjukkan kesamaan sekuens hasil isolasi antara 52,4%–97,6% dengan gen GH ikan lainnya, dengan persentase homologi tertinggi adalah dengan ikan sepat. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sekuens hasil isolasi merupakan sekuens gen GH. Dari hasil analisis sekuens terlihat bahwa gen GH ikan gurame secara evolusi adalah konserf.

ABSTRACT: *cDNA cloning of giant gouramy growth hormone. By: Estu Nugroho, Alimuddin, Anang Hari Kristanto, Odang Carman, Novi Megawati, and Komar Sumantadinata*

*Research on cDNA cloning encoded the gouramy growth hormone was conducted. The aim of the research was to get complementary DNA, cDNA, sequences of growth hormone as an initial step to develop genetic engineering of gouramy fish. Four pituitary glands of the gouramy were taken and then processed with total RNA extraction, and continued with cDNA synthesis, PCR amplification, DNA fragment purification from the gel, PCR product legation with cloning vector, transformation and incubation of bacteria, white colony bacteria selection, plasmid isolation and sequencing analysis. Sequencing result showed that the amplified PCR product length had 834 bp, encoding 204 amino acid residue and contained conserve sequence for GH (growth hormone) gen. Homolog analysis showed sequence similarity of isolated result between 52.4%–97.6% with other GHs with the highest percentage resulted from the *Trichogaster pectoralis*. From the sequence analysis showed that GH gen of gouramy at an evolutionary manner was conserve.*

KEYWORDS: *cDNA, cloning, growth hormone, giant gouramy*

PENDAHULUAN

Hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) merupakan salah satu hormon yang disekresikan oleh somatotrof dari kelenjar pituitari. Hormon ini banyak diteliti dan digunakan sebagai model untuk ilmu fisiologi,

pengaturan ekspresi gen, hubungan struktur, dan fungsi serta evolusi gen. GH memiliki peran penting dalam pengaturan pertumbuhan dan perkembangan dengan cara mendukung proses pembelahan, diferensiasi, dan pembesaran ukuran sel (Copeland & Nair, 1994). Pada ikan, GH juga mempengaruhi

^{*)} Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

^{**)} Departemen Budidaya Perairan-FPIK, Institut Pertanian Bogor

osmoregulasi (Sakamoto *et al.*, 1993) dan reproduksi (Le Gac *et al.*, 1993; van Der Kraak *et al.*, 1990). Pentingnya GH sebagai sebuah agen pengatur pertumbuhan dan potensi aplikasinya dalam industri perikanan budidaya ikan membuat riset tentang GH banyak dilakukan dalam dekade terakhir ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian GH meningkatkan laju pertumbuhan dengan tingkatan yang bervariasi pada sejumlah spesies ikan (Ben-Atia *et al.*, 2000; Cavri *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1997). Bahkan dengan cara over-ekspresi gen GH, laju pertumbuhan ikan meningkat secara drastis yang bisa mencapai 30 kali lipat lebih cepat (Devlin *et al.*, 1994; Nam *et al.*, 2001). Namun demikian, di Indonesia penelitian tentang GH masih sangat sedikit.

Hormon pertumbuhan berperan penting dalam pengaturan pertumbuhan dan perkembangan sel somatik. Hal ini telah dibuktikan bahwa penambahan kandungan GH di dalam tubuh ikan meningkatkan laju pertumbuhan dan ukuran tubuhnya secara drastis. Hasil yang serupa diduga dapat dicapai pula pada ikan gurame bila konsentrasi GH dalam tubuhnya ditingkatkan. Sejalan dengan perkembangan ilmu biologi molekuler di bidang perikanan dan dengan mempertimbangkan aspek keamanan pangan serta kelestarian sumberdaya genetik, akhir-akhir ini ahli transgenesis memilih untuk menggunakan konstruksi gen dengan komponen penyusun semuanya dari ikan (*all-fish gene construct*). Salah satu komponen dari *all-fish gene construct* adalah cDNA GH dari ikan. Isolasi dan karakterisasi GH merupakan langkah awal dalam rangka perbaikan kecepatan tumbuh ikan gurame melalui rekayasa gen.

Ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki harga jual tinggi dan pengembangan usaha budidayanya telah menjadi salah satu fokus revitalisasi perikanan budidaya 2006-2009 (DKP, 2005). Namun demikian, pertumbuhan yang relatif lambat merupakan salah satu masalah utama pengembangan budidaya ikan gurame, yang diduga sebagai konsekuensi langsung dari laju pertumbuhan somatik yang rendah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk (1) memperoleh sekuens DNA komplemen (*complementary DNA*, cDNA) hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) sebagai langkah awal dalam rangka pengembangan teknologi rekayasa genetik

ikan gurame, dan (2) untuk mengetahui pola distribusi dan ontogeni ekspresi gen GH ikan gurame.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi RNA Total dari Kelenjar Hipofisa

Kelenjar hipofisa diambil dari 4 ekor ikan gurame dan dimasukkan ke dalam tabung mikro (*microtube*) bervolume 1,5 mL yang diletakkan di atas *dry-ice*. Ekstraksi RNA total dari kelenjar hipofisa dilakukan menggunakan ISOGEN (Nippon Gene, Japan) dengan prosedur sesuai manual. RNA total hasil ekstraksi dilarutkan dengan 30 μ L air steril (SDW) berisi DEPC. Konsentrasi RNA diukur menggunakan mesin DNA/RNA quant. Konsentrasi RNA total yang diperoleh adalah 528 ng/ μ L.

Sintesis cDNA

Sebanyak 3 μ g RNA total hasil ekstraksi digunakan untuk sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan kit Ready-to-Go You Prime First Strand cDNA synthesis beads (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) dengan prosedur sesuai manual. Pada reaksi ini digunakan 1 mg primer "dT3 `RACE-VECT"(5`-GTAATACGAATAACTAT-AGGGCACGCGTGGTC GACGGCCCGGGCTGGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3`). Reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya ke dalam tabung mikro berisi cDNA ditambahkan SDW sebanyak 50 μ L sehingga volume akhir menjadi sekitar 80 μ L. Larutan cDNA disimpan dalam *freezer* -20°C hingga akan digunakan.

Amplifikasi PCR

Proses amplifikasi fragmen gen GH dengan PCR dilakukan menggunakan primer forward "Fw-GH" seperti dijelaskan di atas dan primer reverse AP-1 (5`-CCATCCTAATACGACTACTA TAGGGC). Tiga tabung mikro bervolume 200 μ L disiapkan dan diisi bahan-bahan reaksi PCR dengan volume total 10 μ L. Komposisi reaksi PCR mencakup 1 μ L LA Buffer, 1 μ L dNTPs mix, 1 μ L MgCl₂, 1 μ L setiap primer, 0,05 μ L LA *Taq* polymerase (TAKARA), 1 μ L cDNA dan sisanya adalah SDW. Amplifikasi PCR dilakukan dengan program: 1 siklus pada suhu 94°C selama 3 menit; 35 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, 59°C selama 30 detik, dan 72°C selama 1 menit; serta 1 siklus pada suhu 72°C selama 3 menit. Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agarosa 0,7%.

Purifikasi Fragmen DNA dari Gel

Fragmen DNA produk amplifikasi PCR dipotong dari gel agarosa dan kemudian diekstrak dari gel menggunakan kit purifikasi DNA (MoBio Laboratories, CA, USA) sesuai instruksi dimanual. DNA dilarutkan dengan 12 μ L SDW. Sebanyak 2 μ L hasil isolasi DNA dari gel dielektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%.

Ligasi Produk PCR dengan Vektor Kloning

Fragmen DNA hasil purifikasi dari gel selanjutnya diligasi dengan vektor kloning pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA). Komposisi reaksi ligasi meliputi 5 μ L larutan DNA hasil purifikasi; 0,5 μ L pGEM-T Easy; 6,5 μ L 5x *buffer* ligasi, dan 1 μ L enzim T4 DNA ligase (Promega). Inkubasi dilakukan selama 2 jam pada suhu ruang, kemudian inkubasi dilanjutkan semalam di dalam refrigerator (suhu sekitar 4°C).

Transformasi dan Inkubasi Bakteri

Sebanyak 6,5 μ L hasil reaksi ligasi dicampur ke dalam tabung mikro berisi sel kompeten bakteri *E. coli* DH-5a. Transformasi dilakukan dengan cara kejutan panas pada suhu 42°C selama 45 detik. Setelah diinkubasi *on-ice* selama 2–3 menit, ke dalam tabung mikro ditambahkan 900 μ L larutan SOC (1,2 g polypeptone; 0,3 g *yeast extract*; 0,035 g NaCl; 0,011 g KCl; 600 μ L MgCl₂ 1M; 600 μ L MgSO₄ 1M; dan 60 μ L glucose 2M dalam 60 mL SDW). Selanjutnya inkubasi dilanjutkan pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian bakteri disebar di atas cawan agarosa 2xYT (1,6% polypeptone, 1% *yeast extract*, 0,5% NaCl dan 1,5% agarosa dalam SDW) yang mengandung IPTG, X-gal dan ampisilin (disingkat menjadi 2xYT-A,I,X). Cawan agarosa berisi bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam.

Seleksi Koloni Bakteri Putih dan Pembuatan Master Plate

Koloni bakteri putih yang tumbuh dalam cawan agarosa diduga membawa plasmid dengan insersi gen GH ikan gurame. Koloni tersebut diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dioleskan ke tabung mikro bervolume 1,5 mL dan dilanjutkan dengan penggosokan pada cawan agarosa 2xYT-A,I,X untuk membuat *master plate*. *Master plate* merupakan cawan agarosa mengandung koloni bakteri yang diduga membawa plasmid mengandung

fragmen DNA insersi, yang dapat digunakan sebagai sumber koloni bakteri untuk penelitian berikutnya. *Master plate* diinkubasi pada suhu 37°C sekitar 8 jam.

Selanjutnya, metode *cracking* digunakan untuk mengetahui apakah semua bakteri koloni putih yang dipilih dan dikultur dalam *master plate* membawa plasmid dengan insersi DNA. Ke dalam tabung mikro volume 1,5 μ L yang berisi bakteri ditambahkan 10 μ L *buffer cracking* (0,2 g saccharosa, 40 μ L NaOH 5 M, 50 μ L SDS 10% dan sisanya SDW sehingga larutan menjadi 1 mL), 10 μ L larutan EDTA 1 M dan sekitar 2 μ L 6x *buffer loading* berisi KCl 1 M dengan perbandingan volume 1:1. Setelah diinkubasi sekitar 5 menit, dilakukan sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 10 μ L supernatan yang terbentuk dielektroforesis dengan gel agarosa 0,7%.

Sebanyak 2 klon bakteri (no. 3 dan 4) yang membawa insersi diambil dari *master plate* menggunakan tusuk gigi steril dan disentuhkan ke media cair 2xYT yang mengandung ampisilin dalam tabung berbentuk "L". Inkubasi bakteri dilakukan pada suhu 37°C selama sekitar 14 jam.

Isolasi Plasmid

Isolasi plasmid dilakukan menggunakan kit FlexiPrep (Amersham Biosciences, NJ, USA) dengan prosedur sesuai manual. Bakteri dari setiap tabung "L" dituang ke dalam tabung mikro bervolume 1,5 mL. Bakteri diendapkan dengan cara sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm sekitar 1 menit. Supernatan dibuang dan ke dalam tabung mikro berisi pelet bakteri ditambahkan larutan I sebanyak 200 μ L, dilanjutkan dengan vorteks hingga semua pelet bakteri lepas dari dasar tabung mikro. Kemudian ditambahkan larutan II sebanyak 200 μ L, tabung mikro dibolak-balik sekitar 10 kali sebelum ditambahkan dengan larutan III sebanyak 200 μ L. Tabung dibolak-balik lagi hingga terbentuk gumpalan-gumpalan berwarna putih, dilanjutkan dengan sentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro yang baru, disentrifus sekali lagi pada kecepatan dan lama waktu yang sama dengan proses sebelumnya. Supernatan dipindahkan ke tabung mikro berisi isopropanol 420 μ L. Vorteks selama sekitar 1 menit, dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Kemudian tabung mikro tersebut disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama

15 menit. Setelah isopropanol dibuang dengan bantuan aspirator (pengisap), ke dalam tabung mikro berisi pelet DNA ditambahkan Sephaglas sebanyak 150 µL, vorteks selama 1 menit dan dilanjutkan dengan sentrifus 13.000 rpm selama 30 detik. Supernatan dibuang dan ke dalam tabung ditambahkan larutan *wash buffer* sebanyak 200 µL, vorteks selama 1 menit dan kemudian disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Larutan *wash buffer* dibuang dan diganti dengan etanol 70% dingin sebanyak 300 µL, vorteks selama 1 menit dan kemudian disentrifus 13.000 rpm selama 30 detik. Setelah semua etanol dibuang, tabung mikro dibiarkan kering udara selama sekitar 10 menit. Plasmid DNA dilarutkan menggunakan SDW sebanyak 50 µL, setelah divorteks tabung mikro berisi plasmid dibiarkan selama 5 menit di suhu ruang. Sentrifus pada suhu ruang dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1-2 menit. Supernatan yang berisi plasmid DNA dipindahkan ke tabung yang baru. Sebanyak 1 µL hasil isolasi digunakan untuk elektroforesis. Konsentrasi DNA plasmid hasil isolasi diukur menggunakan mesin DNA/RNA quant. Konsentrasi DNA untuk sampel 1 dan 2 masing-masing adalah 264 ng/µL dan 324 ng/µL.

Sekuensing dan Analisis Sekuens

Volume reaksi PCR untuk sekuensing adalah 20 µL dengan komposisi 2 µL Ready Reaction Mix; 3 µL BigDye buffer; 6,4 µL primer "T7-BS" (5'-TTGTAAT-ACGACTCACTATAGGGCC AA-3') atau DyeT-R (5'-GGAATTGTGAGCGGA-TAACA-3') dengan konsentrasi 10 pmol; 300 ng DNA, dan sisanya adalah air steril. Program PCR yang digunakan yaitu 1 siklus 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" dengan prosedur sesuai dengan protokol. Program BLAST digunakan untuk mengetahui apakah sekuens nukleotida hasil sekuensing mirip dengan gen-gen GH yang ada di Bank Gen.

Kodon stop gen GH ikan gurame adalah TAG yang terletak pada nukleotida 409-511. Panjang sekuens terminal 3 tidak terkodekan (3'-UTR, *UnTranslated Region*) adalah 192 nukleotida. Dalam sekuens 3'-UTR tersebut terdapat sekuens konserf (*conserve sequence*) untuk penanda poliadenilasi (*polyadenylation*

signal, AATAAA) pada nukleotida 661-666, dan sekuens akhir poliadenilasi (*polyadenylation tail*) pada nukleotida 683-703.

HASIL DAN BAHASAN

Sekuens nukleotida hasil sekuensing ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil analisis BLAST, sekuens hasil kloning adalah sangat mirip dengan gen GH dari berbagai jenis ikan, khususnya ikan kelompok anabantid (data tidak ditampilkan). Dengan demikian diduga bahwa sekuens hasil kloning tersebut merupakan gen GH ikan gurame. Panjang sekuens GH ikan gurame hasil kloning adalah 843 bp yang menyandikan 204 asam amino residu. Kodon awal (*start codon*) dan kodon akhir (*stop codon*) masing-masing terletak pada nukleotida (nt) 16-18 dan nt. 628-630 dihitung dari ujung terminal 5. Panjang sekuens terminal 5 yang tidak mengkodekan asam amino (5'-UTR, *untranslated region*) hasil kloning adalah 15 bp. Sekuens terminal 5 tersebut diduga belum semua berhasil diisolasi. Metode 5'-RACE perlu diaplikasikan untuk kloning semua sekuens ujung terminal 5. Sementara itu, total sekuens 3'-UTR berhasil diisolasi, dengan panjang sekuens 213 bp. Hal ini ditunjukkan dengan adanya semua sekuens konserf (*conserve sequence*) pada 3'-UTR, yaitu penanda poliadenilasi (*polyadenylation signal*, AATAAA) yang terletak pada nt. 780-785 dan sekuens ujung poliadenilasi (*polyadenylation tail*) pada nt. 801-843 dihitung dari ujung terminal 5.

Analisis homologi asam amino residu antara gen GH gurame dengan gen GH dari beberapa kelompok ikan menunjukkan bahwa GH ikan sepat memiliki homologi tertinggi dengan GH ikan gurame. GH ikan gurame mempunyai kesamaan 97,6% dengan ikan sepat mutiara (*Trichogaster leerii*, AY873789); 97,1% dengan ikan sepat biru (*Trichogaster trichopterus*, AF157633); 89,2% dengan ikan kerapu totol merah (*Epinephelus akaara*, AY326406) dan ikan kerapu kuning (*Epinephelus awoara*, AF232711); 83,8% dengan ikan nila (*Oreochromis niloticus*, M26916); 82,8 dengan ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*, AF033806); 63,3% dengan ikan salmon Atlantik (*Salmo salar*, X14305); 62,4% dengan ikan *rainbow trout* (*Oncorhynchus mykiss*, M22732); 52,8% dengan ikan mas (*Cyprinus carpio*, DQ350436), dan 52,4% ikan *silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*, X60475). Tingkat homologi sekuens gen GH antar kelompok ikan di atas menunjukkan adanya

```

10      20      30      40      50      60
gatttcacaaccgctATGGACAAAAGTTGTGTTCTCTGCTGTCTGTCTCTGTGGGCGTC
      M D K V V F L L S V L S V G V

70      80      90      100     110     120
TCCTCTCAGCCAATCACAGACAGCCAGCGTCTCTTCTCCATCGCCGTGAGCAGAGTCCAA
S S Q P I T D S Q R L F S I A V S R V Q

130     140     150     160     170     180
CACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCCGACTTCGAGAGCTCTTTGCAGACTGAG
H L H L L A Q R L F S D F E S S L Q T E

190     200     210     220     230     240
GAGCAGCGTCAACTCAACAAAATCTTCTGTCAGGATTTTTGTAACTCAGATTACATCATC
E Q R Q L N K I F L Q D F C N S D Y I I

250     260     270     280     290     300
AGCCCTATCGACAAGCAGCAGACCCAGCGCAGCTCTGTGCTGAAGCTGTTATCGATCTCT
S P I D K H E T Q R S S V L K L L S I S

310     320     330     340     350     360
TATCGGCTGATCGAGTCTGGGAGTTCGCCAGCCGGTCTCTGTATGGAGGTTCTGCTCAA
Y R L I E S W E F P S R S L Y G G S A Q

370     380     390     400     410     420
AGATACCAGATTTCTCCCAAAGTGTGCGGAGCTGATGCGAGGAATCCAGCTGCTGATCAAG
R Y Q I S P K L S E L M R G I Q L L I K

430     440     450     460     470     480
GCCAATCAGGATGGAGCAGAGATGTTCTCTGACGGCGTGGTTCGCGAGCTCGCTCCGTAC
A N Q D G A E M F S D G V V P Q L A P Y

490     500     510     520     530     540
GGAAACTACTACCAGAGTCTGGGAGATGACGAGTCGCTGAGACGCAGCTATGAACTGCTG
G N Y Y Q S L G D D E S L R R S Y E L L

550     560     570     580     590     600
GCCTGCTTCAAAAAGGACATGCACAAGGTGGAGACGTACCTGACTGTGGCTAAATGCCGA
A C F K K D M H K V E T Y L T V A K C R

610     620     630     640     650     660
CTCTCTCCAGAAGCTAACTGCACTCTGTAGcccccccatctggacaatgacatcatcgtg
L S P E A N C T L *

670     680     690     700     710     720
tttgttctatagccctgttctttactctgtgaactagcattagcaatagcattagcctct

730     740     750     760     770     780
ttctggtggttttttgttgaggttgaacacaaagtgatgtcacactgtcagtacatgaa

790     800     810     820     830     840
ataaagttttgattctgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
850
aaa

```

Gambar 1. Sekuens nukleotida dan asam amino residu gen GH ikan gurame. Tanda asterisk adalah kodon akhir (TAG). Sekuens nukleotida ditulis dengan huruf kecil merupakan bagian dari ujung terminal 5'- dan 3'-UTR (*untranslated region*). Penanda poliadenilasi (*polyadenylation signal*, AATAAA) terletak pada nukleotida 780-785 yang digarisbawahi. Ujung poliadenilasi (*polyadenylation tail*) pada nukleotida 801-843 yang ditulis miring

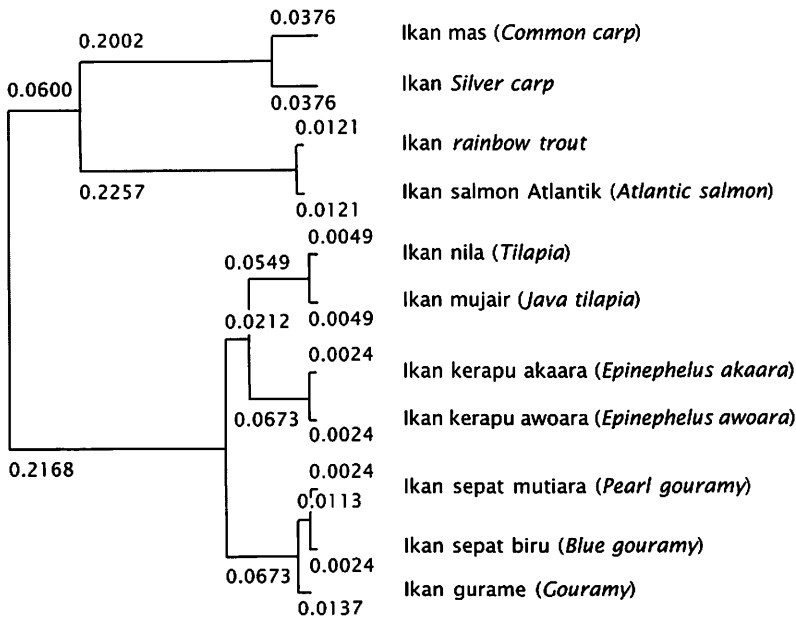
Figure 1. Nucleotide sequences and amino acid residues of gouramy GH gen. Asterik sign ends codon (TAG). Nucleotide sequence, written in lower case is 5' terminal tail and 3' UTR (*untranslated region*). Polyadenylation signal, AATAAA, underlined, is located on 780-785. Polyadenylation tail, in italic, is on nucleotide 801-843

hubungan yang erat dengan klasifikasi secara morfologis, paling tidak hingga level famili. Dengan demikian sekuens gen GH mungkin dapat digunakan dalam analisis kekerabatan ikan, meskipun hal ini perlu data lebih banyak dan analisis lebih lanjut. Hasil analisis pohon filogenetik menggunakan sekuens asam amino residu (Gambar 2) juga mengelompokkan ikan-ikan tersebut berdasarkan klasifikasi yang ada secara tepat. Dua spesies pertama merupakan satu kelompok anabantid dengan ikan gurame, sedangkan untuk ikan lainnya masing-masing mewakili kelompok ikan seranid (termasuk ikan laut), ikan cyclid (termasuk ikan tawar), dan kelompok ikan cyprinid (termasuk ikan air tawar).

Analisis sekuens konserf dan domain protein yang diturunkan dari cDNA hasil kloning (Gambar 3) menunjukkan adanya beberapa

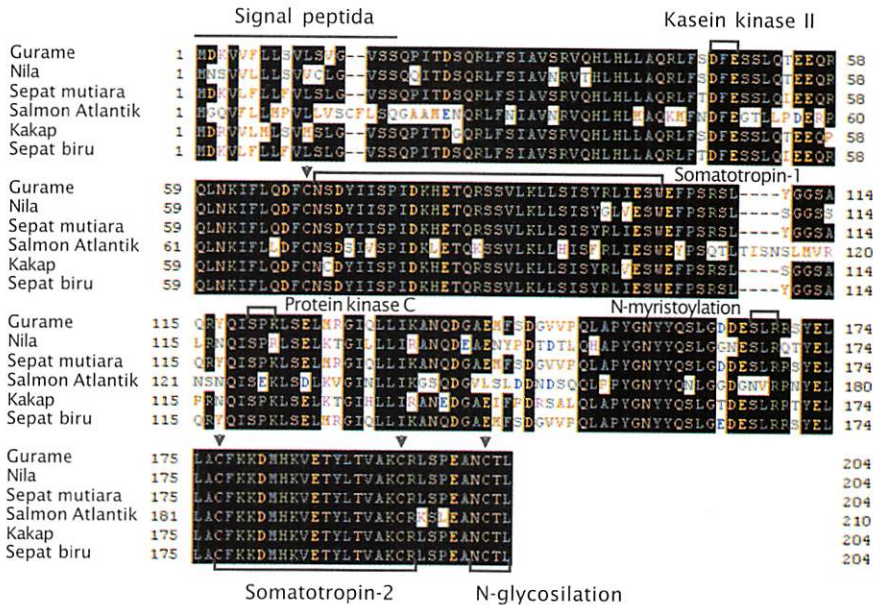
situs yaitu: signal peptida somatotropin-1, somatotropin-2, kinase kasein II fosforilasi, kinase protein C fosforilasi, N-miristoilasi dan N-glikosilasi, serta 4 sistein (cystein, C, ditunjukkan dengan kepala panah). Domain-domain tersebut juga umum ditemukan pada GH ikan, sehingga cDNA Dengan demikian hasil analisis ini memperkuat dugaan bahwa sekuens hasil kloning merupakan sekuens gen GH ikan gurame. Gen GH hasil kloning dapat bermanfaat untuk mempelajari regulasi ekspresi gen GH dalam hubungannya dengan pertumbuhan ikan gurame. Pembuatan rekombinan protein GH dan konstruksi gen juga dapat dilakukan dalam rangka perbaikan kecepatan tumbuh ikan gurame di masa datang.

Fungsi domain-domain protein yang ada dalam GH telah dijelaskan dalam Syaifuddin *et al.* (2007). Domain yang mempunyai kesamaan



Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan sekuens asam amino residu gen GH berbagai jenis ikan. Sekuen gen GH ikan gurame dari studi ini, ikan sepat mutiara (no. akses Bank Gen: AY873789), ikan sepat biru (AF1 57633), ikan kerapu total merah (AY326406), ikan kerapu kuning (AY038606), ikan nila (M26916), ikan mujair (AF033806), ikan salmon Atlantik (X14305), ikan rainbow trout (M22732), ikan mas (DQ350436), dan ikan silver carp (X60475)

Figure 2. Filogenetic tree based on amino acid sequences of GH gen form various fishes. GH sequences of gouramy from this study, Pearl gouramy (Gen bank acess AY873789), blue gouramy, red-spotted grouper (AY326406), yellow gouper (AY 038606), Nile tilapia (M26916), Java tilapia (AF033806), Atlantic salmon (X14305), rainbow trout (M22732), common carp (DQ350436), and silver carp (X60475)



Gambar 3. Alignment sekuens asam amino residu dan posisi sekuens konserf bagi gen GH ikan gurame dibandingkan dengan gen GH ikan sepat mutiara (AY873789), ikan sepat biru (AF157633), ikan nila (M26916), ikan salmon Atlantik (X14305), ikan rainbow trout (M22732), dan ikan kakap gilthead sea bream (S54890)

Figure 3. Sequence alignment of amino acid residues and the position of conserve sequence of gouramy GH gen compare to the pearl gouramy (AY873789), blue gouramy (AF157633), nile tilapia (M26916), Atlantic salmon (X14305), rainbow trout (M22732), and gilthead sea bream (S54890)

100% terhadap kelompok ikan yang dianalisis adalah N-glikosilasi, somatotropin-2, kasein kinase II, dan 4 sistein. Domain N-glikosilasi mengandung 4 asam amino residu, yaitu asparagine, sistein, treonine dan leusine. N-glikosilasi ini memiliki 2 asam amino esensial yaitu treonine dan leusine. N-glikosilasi terlibat di dalam regulasi aktivitas transpor dan ekspresi permukaan dari transporter neurotransmitter (Bennet & Kanner, 1997 dalam Syaifudin *et al.*, 2007). Empat residu sistein dikenali dari ikatan disulfida di dalam molekul GH, keberadaannya sangat penting untuk aktivitas biologi dan integritas struktural hormon (Venugopal *et al.*, 2002 dalam Li *et al.*, 2005). Somatotropin-1 mempunyai domain yang bervariasi dibandingkan dengan somatotropin-2. Somatotropin-1 ikan gurame memiliki 100% sama dengan ikan sepat yang juga termasuk kelompok anabantid. Dua asam amino residu berbeda antara ikan gurame dengan ikan nila (G dan V) dan kakap (C dan V). Kinase kasein II gurame memiliki 4 asam amino yang konserf yaitu serine, asam aspartat,

fenilalanine, dan asam glutamat. Namun pada beberapa ikan asam amino serine digantikan oleh asparagine. Kinase protein mempunyai fungsi utama sebagai penghubung sinyal intraseluler. N-miristoilasi adalah modifikasi protein eukariotik dan virus dalam pengikatan di membran sehingga mengubah fungsi protein seluler yang dimodifikasi (Maurer-Stroh, 2002 dalam Syaifudin *et al.*, 2007). Protein hasil miristoilasi berperan dalam sinyal transduksi, apoptosis (ekspor protein ekstraseluler alternatif).

KESIMPULAN

1. cDNA hormon pertumbuhan ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) hasil kloning mempunyai ukuran 843 bp yang menyandikan 204 asam amino residu.
2. Sekuens GH ikan gurame mengandung elemen-elemen yang konserf untuk gen GH.
3. Sekuens GH ikan gurame memiliki homologi tertinggi (97%) dengan ikan sepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA tahun anggaran 2007 Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Goro Yoshizaki (Laboratorium Fisiologi ikan, Department of Marine Bioscience, Tokyo University of Marine Science and Technology) atas bantuannya dalam sequencing.

DAFTAR PUSTAKA

- Ben-Atia, I., M. Fine, A. Tandler, B. Funkenstein, S. Maurice, B. Cavari, and A. Gertler. 2000. Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 155-164.
- Cavri, B., B. Funkenstein, and T.T. Chen. 1993. Effects of growth hormone on the growth rate of the gilthead seabream (*Sparus aurata*), and use of different constructs for production of transgenic fish. *Aquaculture.* 111: 189-197.
- Cheng, C.M., C.N. Lin, M. Shablott, L.I. Gonzales-Villasenor, D.A. Powers, C. Woods, and T.T. Chen. 1995. Production of biologically active recombinant growth hormone in *E. coli* cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108: 75-85.
- Copeland, K.C. and K.S. Nair. 1994. Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 78: 1,040-1,047.
- Devlin, R.H., C.A. Biagi, T.Y. Yesaki, D.E. Smailus, and J.C. Byatt. 1994. Growth of domesticated transgenic fish. *Nature.* 409: 781-782.
- DKP. 2005. Revitalisasi: perikanan budidaya 2006-2009. 275 pp.
- Li, W.S., D. Chen, A.O.L. Wong, and H.R. Lin. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *J. Endocrinol.* 144: 78-89.
- Le Gac, F., O. Blaise, A. Fostier, P.Y. Le Bail, M. Loir, B. Mourot, and C. Weil. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 219-232.
- McLean, E., E.M. Donaldson, E. Teskeredzic, and L.M. Souza. 1993. Growth enhancement following dietary delivery of recombinant porcine somatotropin to diploid and triploid of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. Biochem.* 11: 363-369.
- Nam, Y.K., J.K. Noh, Y.S. Cho, H.J. Cho, K.N. Cho, C.G. Kim, and D.S. Kim. 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* 10: 353-362.
- Tsai, H.J., M.H. Hsieh, and J.C. Kuo. 1997. *Escherichia coli*-produced growth hormone as feed additive to enhance the growth of juvenile black seabream. *J. Appl. Ichthyol.* 13: 79-82.
- Van Der Kraak, G., P.M. Rosenblum, and R.E. Peter. 1990. Growth hormone-dependent potentiation of gonadotropin-stimulated steroid production by ovarian follicles of the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 233-239.
- Syaifudin, M., Alimuddin, U. Widyastuti, A.O. Sudrajat, K. Sumantadinata, and R.S. Aliah. 2007. cDNA encoding growth hormone from humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *BIOTROPIA.* 14(2): 1-8.
- Sakamoto, T., S.D. McCormick, and T. Hirano. 1993. Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 155-164.