

ISOLASI FRAGMEN TERTENTU GEN HORMON PERTUMBUHAN IKAN MAS MAJALAYA DAN NILA GIFT DENGAN METODE CTAB-PCR

Ibnu Dwi Buwono dan Maman Herman Suparta

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjajaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Jatinangor, Bandung-UBR 40600
E-mail: ibnudw1@yahoo.com

(Naskah diterima: 19 Agustus 2008; Disetujui publikasi: 2 Juli 2009)

ABSTRAK

Hormon pertumbuhan (*Growth Hormone/GH*) pada ikan berperan untuk memacu pertumbuhan, di samping terlibat juga dalam fungsi osmoregulasi, pengaturan keseimbangan cairan elektrolit, dan proses-proses metabolisme. Metode CTAB (*Cetyl Trymethyl Ammonium Bromide*) digunakan untuk mengisolasi DNA sel ikan (DNA genomik) dari sirip ekor ikan mas Majalaya dan nila GIFT. Isolasi gen hormon pertumbuhan dari DNA genomik kedua jenis ikan dapat disintesis dengan primer cGH (*carp Growth Hormone*) dan TiGH (*Tilapia Growth Hormone*) menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hasil elektroforegram produk amplifikasi PCR untuk sebagian gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya dapat dideteksi dengan ukuran fragmen DNA sebesar 615 bp dan 349 bp. Fragmen DNA hormon pertumbuhan ikan nila GIFT dapat dideteksi dengan ukuran 597 bp.

KATA KUNCI: fragmen gen, hormon pertumbuhan, ikan mas Majalaya, nila GIFT, CTAB PCR

ABSTRACT: *Isolation of partial fragments of growth hormone of Majalaya carp fish and GIFT nile using CTAB-PCR methods. By: Ibnu Dwi Buwono and Maman Herman Suparta*

The roles of growth hormones in fish are for growth promotion. They are also involved in osmoregulation function, balance regulation of liquid electrolite, and correlated with metabolism processes. CTAB (Cetyl Trymethyl Ammonium Bromide) methods was used to isolate fish cell DNA (genomic DNA) from caudal fin of Majalaya carp and GIFT nile. Growth hormone gene isolates from two kinds of genomic DNA can be synthesized with primers cGH (carp Growth Hormone) and TiGH (Tilapia Growth Hormone) using PCR (Polymerase Chain Reaction) method. Electroforegram product of the PCR amplification for partial growth hormone gene of Majalaya carp fish can be detected with DNA fragment size of 615 bp and 349 bp. DNA fragment of growth hormone of GIFT nile tilapia can be detected with size of 597 bp.

KEYWORDS: *growth hormone, gene fragment, Majalaya carp, GIFT nile, CTAB-PCR*

PENDAHULUAN

Ikan nila GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*) merupakan ikan hasil seleksi dan hibridisasi dari berbagai negara (multi-

lokasi) yang mengeksploitasi variasi gen pertumbuhan dari masing-masing hasil persilangan antar nila asal negara berbeda. Pada generasi keenam dari hasil seleksi dan hibridisasi tersebut diperoleh perbaikan

tingkat pertumbuhan yang lebih baik dibanding sumber induknya (Brzeski & Doyle, 1995).

Ikan nila pada mulanya disebut *Tilapia nilotica*, dan perkembangan selanjutnya berubah namanya menjadi *Sarotherodon niloticus*, karena cara pengeraman telurnya diletakkan dalam rongga mulutnya. Lebih lanjut namanya berubah lagi menjadi *Oreochromis niloticus*, disebabkan pengeraman telur hanya dilakukan oleh induk betina (Pullin, 1985; Arifin, 2005).

Prack *et al.* (1980) menunjukkan bahwa pemberian hormon pertumbuhan mamalia efektif dalam meningkatkan laju pertumbuhan ikan mas. Injeksi hormon pertumbuhan *bovine* (lembu) dan ikan mas menyebabkan peningkatan laju pertumbuhan pada *goldfish*. Beberapa hasil penelitian laboratoris menunjukkan suatu keberhasilan transfer gen hormon pertumbuhan ke dalam ikan yang mengakibatkan kecepatan pertumbuhan relatif tinggi pada ikan transgenik (Zhang *et al.*, 1990). Pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan ikan mas Rusia (*crusian carp*) hasil transgenik mencapai pertumbuhan 4 kali lipat dibanding ikan non transgenik, dan pada keturunan generasi pertamanya beberapa ikan mengekspresikan gen hormon pertumbuhan manusia (hGH/*human Growth Hormone*).

Gen hormon pertumbuhan (*Growth Hormone* = GH) merupakan hormon polipeptida rantai tunggal yang disekresikan oleh hipofisis anterior. Peranan utama GH pada vertebrata adalah memacu pertumbuhan somatik. Pada ikan, GH di samping mengaktivasi pemacu pertumbuhan, juga terlibat dalam fungsi osmoregulasi, keseimbangan cairan elektrolit, dan proses-proses yang berhubungan dengan metabolisme (Song *et al.*, 1993).

Untuk memperoleh gen hormon pertumbuhan dapat dilakukan dengan ekstraksi DNA sel ikan guna mengisolasi DNA sel dengan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) sehingga didapat DNA genom (Suharsono, 2005). DNA genom hasil isolasi digunakan sebagai *template* (cetakan) oleh primer penyandi GH untuk mengkopi urutan GH yang dapat dilipatgandakan jumlah kopinya dengan *thermocycler* (mesin PCR/*Polymerase Chain Reaction*) melalui tahapan denaturasi, *annealing* dan *elongation*. Gen hormon pertumbuhan dari beberapa ikan seperti *chum salmon*, *rainbow trout*, *chinook salmon*, *tilapia* (jenis ikan nila) dan *carp* (jenis ikan mas) telah

dapat dikloning dan memberikan ekspresi gen GH pada *E. coli* (Sekine *et al.*, 1985; Tsai *et al.*, 1995).

Dengan demikian untuk memperoleh gen GH ikan mas dan nila dilakukan melalui tahap isolasi dan amplifikasi (perbanyakkan) gen GH kedua jenis ikan berdasar metode CTAB-PCR.

BAHAN DAN METODE

Isolasi DNA genom

Sampel DNA yang digunakan berasal dari sirip ekor ikan yang terlebih dahulu dibersihkan dengan larutan alkohol 95% dan sirip dipotong kecil-kecil menggunakan gunting steril dalam *petridish*. Potongan sirip dimasukkan ke dalam tabung eppendor 1,5 mL yang telah diisi larutan CTAB 400 mL (yang sebelumnya telah dipanaskan dalam *waterbath* suhu 65°C dan diberi merkaptoetanol 100 mL, kemudian digerus dengan sumpit plastik sampai lembut. CTAB ini merupakan deterjen sintesis yang dapat memilah dan menyaring molekul DNA setelah terjadi lisis sel pada saat penggerusan (Suharsono, 2005).

Materi sirip lembut hasil penggerusan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 20 menit. Selanjutnya ditambahkan larutan *Chloroform: Isoamylalcohol* (24:1) sebanyak 500 mL dan *divortex-mixer*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru, serta ditambahkan larutan *Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol* (25:24:1) sebanyak 500 mL. Agar kedua larutan homogen, disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 15 menit sehingga terbentuk supernatan pada lapisan atas, dan lapisan tersebut dipindahkan ke tabung eppendorf baru.

Tahap berikutnya dilakukan penambahan isopropanol dingin sebanyak 350 mL, dan diinkubasikan pada suhu -20°C selama 2 jam. Selesai inkubasi, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada putaran 13.000 rpm selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang sehingga hanya tinggal pelet DNA yang mengendap di dasar tabung. Endapan pelet DNA ini diberi larutan etanol 70% (dingin) sebanyak 600 mL, dan disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan pelet DNA dikering udarkan selama 15 menit, dilanjutkan dengan penambahan larutan TE (*Tris-EDTA*) sebanyak

30–40 mL dan RNase sebanyak 10% volume TE (3–4 mL). Hasil isolat ini kemudian disimpan dalam lemari es untuk pengerjaan elektroforesis.

Elektroforesis Gel Agarosa

Penggunaan elektroforesis gel agarosa dimaksudkan untuk melihat keberadaan hasil isolasi DNA genom ikan berdasarkan laju perpindahan ukuran molekul DNA di bawah pengaruh medan listrik (Wongsosupantio, 1992). Konsentrasi gel agarosa yang digunakan 1%, dibuat dengan cara melarutkan agarosa sebanyak 1 g dalam 100 mL bufer TBE 0,5 x dan selanjutnya dipanaskan dalam *hot plate* dengan *magnetic stirer* sampai hangat, kemudian dituangkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah dipasang sisir (*comb*). Setelah 30 menit, larutan agarosa akan mengeras (membentuk gel). Sisir kemudian diambil sehingga terbentuk sumuran (*well*) sebanyak 12 buah. Gel dimasukkan ke dalam mesin elektroforesis yang berisi larutan TBE 0,5 x sampai seluruh permukaan gel terendam.

Sumur keempat diisi dengan marker I DNA/ Eco RI + Hind III (6 mL) sebagai penanda molekul DNA dan sumur ketiga diisi dengan sampel air deion yang tidak mengandung DNA sebagai kontrol negatif (-). Di atas *parafilm*, ditambahkan empat larutan sampel DNA hasil isolasi (Nila 1, Nila 2, Mas 1, Mas 2) masing-masing 2,5 mL dan ditambahkan sebanyak 2,5 mL *loading dye* pada setiap sampel tersebut, kemudian dimasukkan pada sumur kelima, keenam, ketujuh, dan kedelapan pada gel agarosa.

Elektroforesis dijalankan pada 100 volts selama 60 menit. Selanjutnya gel direndam dalam larutan *ethidium bromide* sebagai pewarna agar DNA dapat berpendar di bawah lampu *ultra violet transilluminator*. Keberadaan DNA pada gel yang terlihat pada lampu tersebut kemudian diabadikan dengan kamera digital lensa makro.

Amplifikasi Gen Hormon Pertumbuhan

Urutan nukleotida hormon pertumbuhan ikan mas dan ikan nila diamplifikasi dari DNA genom hasil isolasi kedua ikan tersebut dengan PCR menggunakan primer penyandi biosintesis gen hormon pertumbuhan. Primer untuk gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya yaitu primer *Forward* (F) : 5' TAATGAGAATGCAGAGGG 3' dan primer *Reverse* (R) : 5' CAGAAAGACAGAGGGAAG 3' (Hinitz & Moav, 1999). Untuk menyandi biosintesis gen hormon pertumbuhan ikan nila GIFT pada DNA genom digunakan primer F : 5' -CAGCGTCTCAGCCTCACTTTGAG- 3' dan primer R : 5' -AAGATTCCGTTTTAAGCTCAG- 3' (Morales *et al.*, 2001).

Komponen-komponen yang digunakan dalam pengerjaan amplifikasi dengan mesin PCR (*thermocycler*) yaitu kit PCR *Core System I*, sampel DNA (*template*), dan primer dengan mengatur secara otomatis suhu, waktu, dan jumlah siklus yang diperlukan. Setiap siklus amplifikasi PCR terdiri atas jumlah yang ditentukan tahapan-tahapan reaksi. Tahapan-tahapan dirancang menggunakan suhu dan lamanya waktu untuk mendenaturasi *tem-*

Tabel 1. Formula campuran bahan dalam reaksi PCR
Table 1. Mixed material formula used in PCR process

Komponen reaksi	MgCl ₂ 1,5 mM	MgCl ₂ 1,75 mM	MgCl ₂ 2,0 mM	MgCl ₂ 2,25 mM
MgCl ₂	3 µL	3.5 µL	4 µL	4.5 µL
Bufer 10 x	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Primer (F)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Primer (R)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
<i>Taq DNA Poly</i>	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL	0.25 µL
DNA template	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Air Deion	<u>34.75 µL</u>	<u>34.25 µL</u>	<u>33.75 µL</u>	<u>33.25 µL</u>
	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tabel 2. Pengaturan suhu untuk tahapan amplifikasi proses PCR
 Table 2. Temperature settings for stages in PCR amplification process

Tahapan	Suhu Temperature (°C)	Waktu (menit) Time (minute)	Jumlah Siklus
Denaturasi Awal	94 °C	2 menit	1 siklus
Siklus PCR :			
1. Denaturasi	94 °C	1 menit	30 siklus
2. Annealing	48 °C	1 menit	
3. Extension	72 °C	1 menit	
Penstabilan	72 °C	7 menit	1 siklus

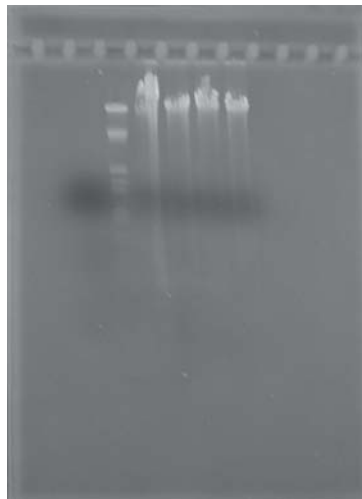
plate, menempelkan (*annealing*) primer-primer dan memanjangkan rantai nukleotida DNA dengan cara polimerisasi.

Suhu *annealing* untuk reaksi PCR *template* ikan nila dan ikan mas sebesar 48°C dan 4 macam konsentrasi MgCl₂ dalam komponen reaksi PCR yaitu MgCl₂ 1,5 mM; MgCl₂ 1,75 mM; MgCl₂ 2,0 mM; dan MgCl₂ 2,25 mM guna

memperoleh produk amplifikasi sekuen gen GH ikan nila dan mas yang jelas (Tabel 1).

Tahap selanjutnya dilakukan pengaturan suhu untuk proses denaturasi awal, denaturasi, penempelan primer (*annealing*) dan pemanjangan nukleotida (*extension*) pada *thermocycler* seperti yang disajikan dalam Tabel 2.

1 2 3 4 5 6 7 8



Keterangan (*Remark*) :

- Sumur 3 = *Loading dye* sebagai kontrol negatif (-)
- Sumur 4 = Marker I DNA / Eco RI + Hind III (6 ml)
- Sumur 5 = Sirip ekor ikan nila 1 (metode CTAB pakai sumpit plastik)
- Sumur 6 = Sirip ekor ikan nila 2 (metode CTAB pakai sumpit plastik)
- Sumur 7 = Sirip ekor ikan mas 1 (metode CTAB pakai sumpit plastik)
- Sumur 8 = Sirip ekor ikan mas 2 (metode CTAB pakai sumpit plastik)

Gambar 1. Elektroforegram isolasi DNA genom ikan mas dan nila
 Figure 1. Electroforegram of DNA isolation of carp and nile fish

HASIL DAN BAHASAN

Elektroforesis Hasil Isolasi DNA Genom

Pada hasil elektroforegram (Gambar 1), terlihat molekul DNA genom hasil isolasi pada sumur kelima, keenam, ketujuh, dan kedelapan dengan nyala yang terang, selain sumur keempat yang berisi marker I DNA / Eco RI + Hind III sebagai penanda keberadaan molekul DNA.

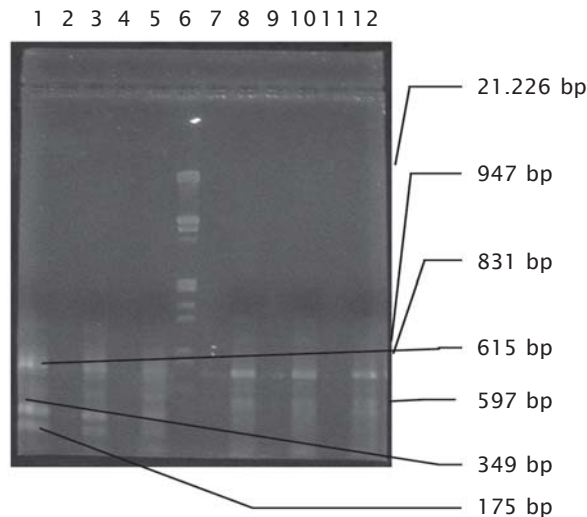
Sebagai kontrol negatif, pada sumur ketiga tidak ditemukan adanya pita DNA karena hanya diisi larutan *loading dye* (tanpa DNA). Pada sumur ke-5 dan 6 yang merupakan sampel sirip ekor ikan nila 1 dan nila 2, diperoleh pita DNA dengan nyala yang jelas dan terang (tidak ada pita RNA), sehingga isolat DNA genom ikan nila tersebut dapat digunakan sebagai *template* (cetakan) DNA untuk pengerjaan amplifikasi gen hormon pertumbuhan nila dengan PCR. Demikian juga untuk sumur ke-7 dan 8, yang berisi sampel sirip ekor ikan mas 1 dan mas 2,

didapatkan elektroforegram pita DNA dengan nyala yang jelas dan terang (tidak terdapat pita RNA), sehingga sampel tersebut dapat digunakan sebagai *template* untuk pengerjaan amplifikasi gen hormon pertumbuhan ikan mas dengan PCR. Pada keempat sampel sirip ekor ikan di atas yang diperoleh hanya pita DNA, sementara pita RNA sudah dihilangkan dengan penambahan RNase, sehingga DNA yang didapat sudah murni.

Elektroforesis Hasil PCR

Berdasarkan elektroforegram hasil amplifikasi produk PCR (variasi empat konsentrasi $MgCl_2$ dan suhu *annealing* $48^\circ C$), dapat dideteksi pita sekuen hormon pertumbuhan ikan mas dan nila (Gambar 2).

Isolasi gen hormon pertumbuhan ikan mas India (*Indian carps*) telah dilakukan oleh Venugopal *et al.* (2002) dari *cDNA* (*complementary DNA*) ikan tersebut dengan ukuran panjang nukleotida sekitar 600 bp. Hasil



Keterangan (Remark):

- Sumur ke-1 = *Template* ikan mas ($MgCl_2$ 1,75 mM)
- Sumur ke-3 = *Template* ikan mas ($MgCl_2$ 2,00 mM)
- Sumur ke-5 = *Template* ikan mas ($MgCl_2$ 2,25 mM)
- Sumur ke-6 = *Marker* I DNA/Eco RI + Hind III (2,5 mL marker I DNA + 2,5 mL LD)
- Sumur ke-8 = *Template* ikan nila ($MgCl_2$ 1,75 mM)
- Sumur ke-10 = *Template* ikan nila ($MgCl_2$ 2,00 mM)
- Sumur ke-12 = *Template* ikan nila ($MgCl_2$ 2,25 mM)

Gambar 2. Produk PCR GH ikan mas dan nila

Figure 2. PCR GH product of carp and Nile fish

amplifikasi produk PCR dari cDNA hormon pertumbuhan ikan mas India jenis *Labeo rohita*, *Cirrhina mrigala*, dan *Catla catla* terdeteksi pada ukuran 590 bp sebagai fragmen DNA tunggal.

Pada elektroforegram produk PCR untuk hormon pertumbuhan menggunakan *template* DNA genom ikan mas Majalaya (Gambar 2), terlihat dua pita yang sejajar baik pada konsentrasi $MgCl_2$ 1,75 mM; $MgCl_2$ 2,00 mM; dan $MgCl_2$ 2,25 mM. Satu pita DNA berada pada ukuran 615 bp dari marker DNA/Eco RI + Hind III dan satu pita pada ukuran 349 bp dari marker tersebut. Pita DNA ukuran 615 bp dan 315 bp merupakan sekuens sebagian dari nukleotida hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya.

Khusus pada pita DNA ikan mas Majalaya yang berada pada 349 bp ini merupakan urutan yang memproduksi mRNA (*messenger Ribo Nucleic Acid*) untuk hormon pertumbuhan dari DNA genom *Cyprinus carpio* (Figueroa *et al.*, 2004). Dikemukakan lebih lanjut bahwa ukuran panjang nukleotida sebesar 320 bp merupakan ekson keempat dan kelima dari DNA hormon pertumbuhan ikan mas (gen GH I) yang memproduksi mRNA untuk hormon pertumbuhan ikan. Sementara untuk ukuran panjang nukleotida 378 bp merupakan ekson keempat dan kelima dari gen GH II ikan mas. Dengan demikian pita DNA pada posisi 349 bp (Gambar 2) diperkirakan ekson keempat dan kelima DNA hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya yang memproduksi mRNA untuk hormon pertumbuhan ikan.

Untuk pita DNA yang berada pada ukuran 615 bp merupakan urutan gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya. Hasil ini sejalan dengan kajian penelitian Venugopal *et al.* (2002) yang juga menunjukkan panjang total cDNA hormon pertumbuhan ikan mas India adalah 600 bp. Panjang urutan cDNA penyandi hormon pertumbuhan 3 jenis ikan mas India (ikan mas *Mrigal*, ikan mas *Catla* dan ikan mas *Rohu*) terdeteksi pada ukuran 590 bp sebagai produk hasil amplifikasi PCR. Pita bagian atas (Gambar 2, *template* ikan mas) dengan ukuran 615 bp, diduga sekuens ekson ke-4 dari GH ikan mas Majalaya, hal ini merujuk pada Chiou *et al.* (1990), ukuran sekuens GH exon ke 4 *Cyprinus carpio* yang bersumber dari DNA genomik adalah 696 bp.

Keberadaan DNA yang tampak pada sumur kedelapan, kesepuluh dan duabelas hasil PCR *template* ikan nila menunjukkan satu pita

DNA dengan nyala terang pada posisi 597 bp (Gambar 2) dari *marker* I DNA. Pita DNA yang berukuran 597 bp tersebut merupakan urutan gen penyandi hormon pertumbuhan ikan nila GIFT. Rentier-Delrus *et al.* (1989) memaparkan bahwa panjang sekuens nukleotida yang memproduksi hormon pertumbuhan *Oreochromis niloticus* sebesar 560 bp. Sehingga, berdasar rujukan tersebut, produk PCR *template* ikan nila GIFT (597 bp) tersebut diduga merupakan hormon pertumbuhan ikan nila. Panjang nukleotida gen penyandi hormon pertumbuhan ikan nila GIFT ini hampir mirip dengan panjang sekuens nukleotida penyandi hormon pertumbuhan pada spesies *Tilapia* (famili ikan nila) yang berukuran 567 bp (Farmer *et al.*, 1976; Farmer & Papkoff, 1979). Sekuen tersebut mengkodekan 189 asam amino penyusun hormon pertumbuhan *Tilapia*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis untuk isolasi gen hormon pertumbuhan ikan, dapat disimpulkan:

1. DNA genom ikan mas Majalaya dan ikan nila GIFT yang dibudidayakan di Indonesia dapat diisolasi dari sirip ekor dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)
2. Isolasi gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya dan ikan nila dari DNA genom kedua ikan telah dapat dilakukan menggunakan teknik PCR yang memakai suhu *annealing* 48°C dan variasi konsentrasi $MgCl_2$ 1,75 mM; $MgCl_2$ 2,00 mM dan $MgCl_2$ 2,25 mM
3. Keberadaan sebagian gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya sebagai produk amplifikasi PCR terdeteksi pada ukuran panjang DNA sebesar 615 bp dan 349 bp serta pada ikan nila GIFT sebesar 597 bp.

SARAN

Agar diperoleh pita DNA yang merepresentasikan gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya dan nila GIFT diperlukan pemurnian (purifikasi) fragmen DNA hormon pertumbuhan kedua ikan tersebut dari gel agarosa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Atas terlaksananya kegiatan penelitian isolasi gen hormon pertumbuhan ikan mas Majalaya dan nila GIFT dengan pendanaan dari

program Insentif Kementerian Negara Riset dan Teknologi tahun anggaran 2007/2008 beserta pihak lain yang membantu, kami mengucapkan terima kasih sebesarnya.

DAFTAR ACUAN

- Arifin, O.Z. 2005. *Polimorfisme mtDNA Keturunan Pertama (F1) Dalam Seleksi Famili Ikan Nila (Oreochromis niloticus) Di BPBI Wanayasa Jawa Barat*. Tesis Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, hlm. 1-5.
- Brzeski, V.J. & Doyle, R.W. 1995. A test of on-farm selection procedure for *Tilapia* growth in Indonesia. *Aquaculture*, 137: 219-230.
- Chen, T.T. & Powers, D.A. 1990. Transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 8: 209-215.
- Chiou, C.S., Chen, H.T., & Chang, W.C. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1,087(1): 91-94.
- Farmer, S.W., Papkoff, H., Bewley, T.A., Hayashida, T., Bern, H.A., & Li, C.H. 1976b. Purification and properties of teleost growth hormone. *Gen. comp. Endocr.*, 30: 91-100.
- Farmer, S.W. & Papkoff, H. 1979. Comparative biochemistry of *Tilapia* pituitary growth hormone, prolactin and the glycoprotein hormones. *Life Sci.*, 20: 1,227-1,232.
- Figueroa, J.E., San Martin, R., Flores, C., & Grothusen, H. 2004. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein carp pituitary—evidence for two expressed genes. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (Diakses tanggal 5 Juli 2007).
- Hinitz, Y. & Moav, B. 1999. Growth performance studi in transgenic, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 173: 285-296.
- Morales, R., Herrera, M.T., Arenal, A., Martinez, R. & Estrada, M.P. 2001. Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Biotech.*, 4(2): 52-57.
- Prack, M., Antoine, M., Caiati, M., Vodonick, M.J., and De Vlaming, V.L. 1980. The effects of mammal prolactin and growth hormone on goldfish, *Carassius auratus*, growth, plasma amino acid levels and liver amino acid up take. *Comp. Biochem. Physiol.*, 67A: 307-310.
- Pullin, R.S.V. 1985. Tilapia : Everyman's Fish. *Biologist*, 32: 84-88.
- Rentier-Delrus, F., Swennen, D., Philippart, J.C., L'Hoir, C., Lion, M., Benrubi, O., & Martial, J.A. 1989. Tilapia growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 8(4): 271-278.
- Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S., & Kawauchi, H. 1985. Cloning and expression of Salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4,306-4,310.
- Song, S., Zhang, T., Zhao, W., Wang, P., and Hew, C.L. 1993. Expression of chinook salmon growth hormone gene in *E. coli*. *Aquaculture*, 111: 199-205.
- Suharsono, S. 2005. Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan Gen dan Pengurutan DNA. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB, hlm. 2-3.
- Tsai, H.J., Ku-Lin, L., Jen-Chien, K., & Shun-Wen, C. 1995. Highly Efficient Expression of Fish Growth Hormone by *Escherichia coli* Cells. *Applied and Microbiology*, 61(11): 4,116-4,119.
- Venugopal, T., Mathavan, S., & Pandian, T.J. 2002. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA and strategy. *J. Biosci.*, 27(3): 261-272.
- Wongsosupantio, S. 1992. Elektroforesis Gel Protein. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 107 hlm.
- Zhang, P., Hayat, M., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T. & Powers, D.A. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GH-cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 3-13.