

RESPONS PERTUMBUHAN DAN EKSPRESI GEN UDANG VANAME, *Litopenaeus vannamei* SETELAH DIRENDAM DALAM LARUTAN HORMON PERTUMBUHAN REKOMBINAN IKAN KERAPU KERTANG

Siti Subaidah^{*)}, Odang Carman^{**)}, Komar Sumantadinata^{***)},
Sukenda^{***)}, dan Alimuddin^{***)}

^{*)} Mahasiswa Pascasarjana Ilmu Akuakultur, Departemen Budidaya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680
E-mail: *ibeth_bambang@yahoo.com*

^{**)} Balai Budidaya Air Payau Situbondo, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, KKP RI
Jl. Raya Pecaron, PO Box 5 Panarukan, Situbondo

^{***)} Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 29 Agustus 2012; Disetujui publikasi: 30 Oktober 2012)

ABSTRAK

Pertumbuhan ikan dapat ditingkatkan menggunakan hormon pertumbuhan rekombinan. Penelitian ini bertujuan mengkaji respons pertumbuhan dan ekspresi gen udang vaname, *Litopenaeus vannamei* setelah direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang, *Epinephelus lanceolatus* (rEIGH). Pada percobaan pertama, post larva stadia 2 (PL-2) sebanyak 1.500 ekor direndam selama 1 jam dalam 1 liter air laut yang mengandung rEIGH lima dosis berbeda, yaitu 150; 15; 1,5; 0,15; dan 0,015 mg/L dan *bovine serum albumin* 0,01%. Setiap perlakuan diulang 3 kali. Perendaman dilakukan dalam kantong plastik ditambah oksigen (volume air : oksigen = 1:5). Udang dipelihara dalam akuarium volume 60 liter dengan kepadatan 25 ekor/liter sampai PL-14. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis 15 mg/L memberikan peningkatan bobot badan, panjang badan, dan sintasan tertinggi ($P < 0,05$) masing-masing sebesar 37,77%; 12,75%; dan 9,45% dibandingkan dengan kontrol. Ekspresi mRNA *single insulin binding domain* (SIBD) pada PL-14 yang dianalisis dengan *real-time* PCR menunjukkan kenaikan sebesar 3,3 kali pada udang yang direndam rEIGH dibandingkan dengan kontrol, dan dapat dinyatakan bahwa SIBD berperan penting dalam induksi pertumbuhan. Tingkat ekspresi *moult inhibiting hormone* meningkat sekitar 13%, sedangkan ekspresi *cyclopilin A* pada udang yang direndam rEIGH sama dengan kontrol. Pada percobaan kedua, perendaman PL-2 dalam larutan rEIGH dosis 15 mg/L dengan lama waktu 3 jam meningkatkan bobot badan sebesar 62,18% lebih tinggi daripada perendaman 1 jam. Dengan demikian, perendaman udang dalam larutan rEIGH meningkatkan pertumbuhan dan ekspresi gen SIBD, dan metode ini dapat berguna dalam peningkatan produksi budidaya.

KATA KUNCI: udang vaname, hormon pertumbuhan rekombinan, perendaman, pertumbuhan, ekspresi gen

ABSTRACT: *Growth response and genes expression of white shrimp Litopenaeus vannamei immersed in recombinant giant grouper growth hormone solution. By: Siti Subaidah, Odang Carman, Komar Sumantadinata, Sukenda, and Alimuddin*

Fish growth can be improved by using recombinant growth hormone. This research was aimed to examine the growth response and genes expression of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* after immersed by different doses of recombinant giant grouper, *Epinephelus lanceolatus* growth hormone (rELGH). At the first experiment, a total of 1,500 post larvae at stadia 2 (PL-2) was bath immersed for one hour in 1 L sea water containing five different doses of rELGH, namely 150, 15, 1.5, 0.15, and 0.015 mg/L, and 0.01% bovine serum albumin. Each treatment was triplicates. Immersion was performed in a plastic bags supplied by oxygen (water volume : oxygen = 1:5). Shrimp was then reared until reach PL-14 stage in 60 L aquarium at density of 25 shrimp per liter. The results showed that the dosage of rELGH 15 mg/L revealed highest increment in body weight, body length and survival by 37.77%, 12.75%, and 9.45% compared to control ($P < 0.05$), respectively. Expression level of single insulin binding domain (SIBD) mRNA analyzed by quantitative real-time PCR analysis in rELGH-immersed PL-14 was about 3.3-fold higher than the control, and this suggested that SIBD plays important role in growth induction. Expression level of moult inhibiting hormone increased about 13%, while expression of cyclopilin A in rELGH treated shrimp was similar to that of control. At the second experiment, immersion of PL-2 in 15 mg/L rELGH solution for 3 hours increased body weight of 62.18% higher compared to 1 hour immersion treatment. Thus, immersion of shrimp in rELGH solution could increase growth and SIBD gene expression, and this technique can be useful to increase aquaculture production.

KEYWORDS: white shrimp, recombinant growth hormone, immersion, growth, gene expression

PENDAHULUAN

Hormon pertumbuhan rekombinan (rGH) merupakan protein yang diproduksi oleh bioreaktor seperti bakteri *Escherichia coli* yang membawa vektor ekspresi gen hormon pertumbuhan. Produksi rGH menggunakan bioreaktor dilakukan setelah diketahui bahwa pemberian hormon pertumbuhan alami dapat memacu pertumbuhan, dan gen penyandinya berhasil diisolasi. Berbagai rGH ikan telah berhasil diproduksi seperti rGH ikan salmon (Sekine *et al.*, 1985), rGH ikan flounder (Jeh *et al.*, 1998), rGH orange-spotted grouper (Li *et al.*, 2003); rGH ikan patin siam (Poen, 2009), rGH ikan mas "rCcGH", rGH ikan gurame "rOgGH" dan rGH ikan kerapu kertang "rELGH" (Alimuddin *et al.*, 2010).

Penelitian aplikasi rGH untuk meningkatkan pertumbuhan umumnya dilakukan pada ikan, di antaranya pada ikan *black seabream* (*Spondyllosoma cantharus*) (Tsai *et al.*, 1997), ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Li *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2007; Alimuddin *et al.*, 2010; Hardiantho *et al.*, 2012), ikan giant catfish (*Pangasianodon gigas*) (Promdonkoy *et al.*, 2004), ikan beronang (*Siganus guttatus*) (Funkenstein *et al.*, 2005), ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Utomo, 2010), ikan gurame (*Osphronemus gouramy*) (Irmawati *et al.*, 2012; Syazili, 2012) dan ikan sidat (Alimuddin *et al.*,

2012). Aplikasi rGH pada udang, khususnya udang vaname masih sangat terbatas. Selain itu, "hormon pertumbuhan" udang belum diketahui dan tentu rekombinannya juga belum ada. Dari referensi yang dapat diakses, dua kelompok peneliti telah melakukan riset penggunaan rGH pada udang. Sonnenschein (2001) melakukan perendaman yuwana udang (bobot badan awal 90 mg) dengan *bovine somatotropin* (bST) dosis 300 mg/L selama 1 jam. Perendaman dilakukan satu kali, kemudian udang dipelihara sampai 2 bulan, terbukti menunjukkan peningkatan bobot badan sebesar 38% dan panjang badan sebesar 11% dibandingkan dengan kontrol. Selanjutnya, Santiesteban *et al.* (2010) merendam post larva udang vaname dengan rGH ikan nila (rtiGH) dosis 100 µg/L dengan frekuensi 7 kali, dan hasilnya pertumbuhan udang meningkat sekitar 42,4% dibandingkan dengan kontrol.

Hasil penelitian Santiesteban *et al.* (2010) menunjukkan bahwa rGH ikan dapat menginduksi pertumbuhan udang, sementara Sonnenschein (2001) memperlihatkan bahwa perendaman satu kali dapat menginduksi pertumbuhan udang secara signifikan. Selanjutnya, dosis yang digunakan oleh Santiesteban *et al.* (2010) yakni 100 µg/L, lebih rendah daripada yang digunakan oleh Sonnenschein (2001) yakni 300 mg/L. Namun

demikian, Sonnenschein (2001) melakukan perendaman satu kali dengan menggunakan bST, sedangkan Santiesteban *et al.* (2010) merendam 7 kali menggunakan rtiGH. Secara teknis, perendaman satu kali lebih praktis. Selain itu, penggunaan rGH dan kemurnian berbeda sangat berpeluang memberikan peningkatan pertumbuhan yang berbeda. Perendaman udang vaname satu kali dengan dosis rGH ikan lain diduga akan memberikan hasil yang sama atau bahkan lebih tinggi daripada capaian Santiesteban *et al.* (2010). Dari hasil penelitian Irmawati *et al.* (2012) diketahui bahwa tingkat produksi rEIGH lebih tinggi daripada rCcGH dan rOgGH. Dosis rEIGH untuk menghasilkan peningkatan pertumbuhan yang sama pada ikan gurame juga lebih rendah daripada rCcGH (Irmawati *et al.*, 2012), sehingga penggunaan rEIGH lebih efisien daripada rCcGH. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan rEIGH. Perendaman *glass eel* ikan sidat dalam larutan rEIGH dosis 12 mg/L meningkatkan bobot badan sebesar 37,4% dibandingkan dengan kontrol (Handoyo, 2012). Dosis perendaman pada udang vaname menggunakan rEIGH diduga akan lebih tinggi daripada yang digunakan pada ikan sidat, karena kulit luar (eksoskeleton) udang keras.

Pada vertebrata, insulin dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-I) merupakan pemain kunci dalam regulasi proses anabolik dalam metabolisme. Pada krustase fungsi peptida mirip insulin ini belum jelas, tetapi dalam penelitian Gutie´rrez *et al.* (2007) menunjukkan adanya insulin *in vivo*, sedangkan Castellanos *et al.* (2008) menunjukkan adanya protein *single insulin binding domain* (SIBD) dari *L. vannamei* yang mempunyai similaritas tinggi dengan IGF *binding protein* ditemukan pada hemosit. Pada penelitian ini ekspresi gen SIBD dianalisis untuk mengevaluasi keterkaitan perubahan laju pertumbuhan udang vaname akibat perlakuan rEIGH.

Pertumbuhan krustase berhubungan dengan penggantian kulit (*moulting*) (Keller, 1992). *Moulting* dikontrol oleh hormon *ecdysteroid* dari Y-organ dalam cepalotorak dan dihambat oleh hormon penghambat (*molt inhibiting hormone*/MIH) dari kelenjar X-organ (Baldaia *et al.*, 1984; Tangprasittipap *et al.*, 2010). Selanjutnya Tangprasittipap *et al.* (2010) menemukan lima kandidat yang menyerupai gen pertumbuhan (homologi tinggi), yaitu *cyclophilin*, *cyclophilin A*, *fibrillarlin*, SPARC, dan PC2. *Cyclophilin A* (CypA)

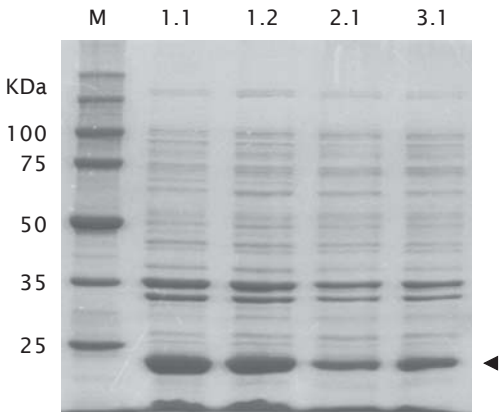
mempunyai korelasi yang tinggi terhadap bobot badan udang windu, *Penaeus monodon*. Oleh karena itu, pada penelitian ini juga dilakukan analisis ekspresi gen CypA dan MIH untuk mengevaluasi keterkaitan perubahan laju pertumbuhan udang vaname akibat perlakuan rEIGH.

BAHAN DAN METODE

Produksi rEIGH

Vektor ekspresi pCold/rEIGH dan metode yang digunakan untuk memproduksi rEIGH mengacu pada Alimuddin *et al.* (2010). Bakteri *Escherichia coli* hasil kultur diendapkan menggunakan sentrifugasi, dan diresuspensi dengan *phosphate buffer saline* (PBS) yang mengandung 0,1% (w/v) Triton X-100, kemudian dilakukan sonikasi (1 menit hidup dan 1 menit mati) sebanyak 6 siklus dengan amplitudo 14%. Suspensi yang terbentuk kemudian disentrifugasi, dan supernatan dibuang. Pelet dibilas sebanyak 2 kali dengan 1 M NaCl yang mengandung 1% (w/v) Triton X-100, dan terakhir dibilas dengan PBS. Sonikasi berfungsi melisis sel-sel dinding bakteri, oleh sebab itu, untuk mendapatkan rEIGH yang lebih bersih diuji dengan 12 siklus sonikasi, dan juga penggantian sonikasi dengan lysozim, untuk kemudian bioaktivitas protein dianalisis.

Badan inklusi (protein total) yang mengandung rEIGH dianalisis menggunakan metode *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk verifikasi keberadaan dan konsistensi produksi rEIGH. Prosedur pengerjaan SDS-PAGE dilakukan berdasarkan metode Walker *et al.* (2002) menggunakan gel akrilamid 15%. Marker ukuran protein yang digunakan adalah *prestained protein marker* (Promega). Ukuran protein rEIGH berdasarkan prediksi yakni sekitar 22 kDa, terdeteksi pada sampel dengan sonikasi 12 siklus (Gambar 1, lajur 1.1), sampel dengan sonikasi 6 siklus (Gambar 1, lajur 1.2), dan sampel dengan lysozim (Gambar 1, lajur 2.1). Bobot protein rEIGH yang terkandung dalam badan inklusi diukur menggunakan nanodrop spektrofotometer. Selanjutnya protein rEIGH disimpan di lemari pendingin -80°C sebelum digunakan untuk perlakuan. Selain itu, dalam penelitian ini dilakukan juga penyimpanan rEIGH di lemari pendingin -20°C selama 1 bulan, dan seperti ditunjukkan pada Gambar 1 lajur 3.1 bahwa secara visual tidak ada perubahan komposisi dan konsentrasi setiap protein.



Gambar 1. Hasil analisis SDS-PAGE terhadap badan inklusi *Escherichia coli* yang mengandung rEIGH (ditunjukkan dengan tanda kepala panah). M = marker protein *prestained protein marker* (Promega). Lajur 1.1 = sampel produksi rEIGH dengan sonikasi 12 siklus; Lajur 1.2 = sampel produksi rEIGH dengan sonikasi 6 siklus; Lajur 2.1 = sampel produksi rEIGH dengan lysozim; Lajur 3.1 = sampel rEIGH disimpan di -20°C selama 1 bulan

Figure 1. The results of SDS-PAGE analysis of inclusion bodies *Escherichia coli* containing rEIGH (indicated by arrow head). M = marker proteins *prestained protein marker* (Promega). Row 1.1 = sample of rEIGH production with 12 cycles sonication; Row 1.2 = sample of rEIGH production with 6 cycles sonication; Row 2.1 = sample of rEIGH production with lysozim; Row 3.1 = sample of rEIGH was stored for 1 month in -20°C

Dengan demikian penyimpanan di lemari pendingin -20°C sekitar 1 bulan dapat dilakukan bila tidak memiliki lemari pendingin -80°C .

Penentuan Dosis Perendaman

Protein rEIGH yang digunakan adalah produksi rEIGH dengan sonikasi 6 siklus. Penentuan dosis rEIGH berdasarkan hasil penelitian Handoyo (2012) yakni pemberian rEIGH pada *glass eel* ikan sidat secara imersi dan diperoleh dosis terbaik 12 mg/L dengan sekali perendaman. Dengan asumsi udang

membutuhkan dosis yang lebih tinggi karena udang memiliki eksoskeleton yang keras, maka dosis tertinggi dibuat menjadi 150 mg/L (P1) dan dilakukan penurunan dosis menjadi 15 (P2); 1,5 (P3); 0,15 (P4); dan 0,015 mg/L (P5). Sebagai kontrol adalah perendaman 15 mg L⁻¹ badan inklusi pCold tanpa sisipan GH (K⁺); dan tanpa perendaman (K). Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan 3 kali dengan desain rancangan acak lengkap.

Hewan uji adalah post larva udang vaname stadia dua (PL-2) yang diperoleh dari pembenihan udang di Situbondo. Penelitian dilakukan di Balai Budidaya Air Payau Situbondo, dengan menggunakan akuarium berukuran (45 cm x 45 cm x 45 cm) dengan volume air 60 liter dan kepadatan awal 25 ekor per liter. Udang vaname PL-2 sebanyak 1.500 ekor direndam selama 60 menit dengan air laut 1 liter yang mengandung larutan rEIGH sesuai dosis masing-masing perlakuan ditambah *bovine serum albumin* (BSA) 0,01%. Perendaman dilakukan dengan cara memasukkan PL-2 tersebut ke dalam plastik kemas volume 6 liter dan diberi oksigen dengan perbandingan volume air : oksigen adalah 1:5.

Parameter kualitas air dikontrol agar media selalu dalam kondisi layak. Pemeliharaan untuk semua perlakuan dihentikan setelah PL-14. Pakan yang diberikan adalah pakan buatan bentuk *flake* (serpihan) dengan kadar protein 48%, dan nauplii *Artemia*. Jumlah pakan buatan untuk PL-2 - PL-14 adalah 2-4 mg/L per aplikasi yang diberikan 5 kali sehari, sedangkan nauplii *Artemia* sebanyak 10-20 nauplii per ekor post larva udang dan diberikan 2 kali sehari.

Untuk menentukan dosis perendaman rEIGH terbaik, dilakukan pengamatan pertumbuhan bobot dan panjang badan. Pengukuran bobot dan panjang dilakukan 6 hari sekali. Bobot diukur dengan mengambil 40 ekor post larva udang secara acak dari setiap akuarium, kemudian ditimbang secara total dengan timbangan analitik (ketelitian 0,001 mg) Pengukuran panjang total dilakukan terhadap 10 ekor udang dengan menggunakan mistar.

Jumlah udang yang hidup setiap akuarium di akhir penelitian dihitung untuk setiap akuarium, kemudian dibagi dengan jumlah penebaran awal, dikalikan 100% untuk menentukan sintasan. Selanjutnya pada akhir penelitian dilakukan penimbangan udang secara total untuk setiap akuarium untuk mendapatkan biomassa.

Penentuan Lama Waktu Perendaman

Setelah diperoleh dosis terbaik, penelitian dilanjutkan untuk menentukan lama waktu perendaman yang memberikan pertumbuhan dan sintasan terbaik. Lama waktu perendaman yang diuji adalah 2 dan 3 jam. Lama waktu pengamatan adalah 18 hari seperti yang dilakukan oleh Laksana (komunikasi pribadi, 2012). Metode perendaman dan pemeliharaan udang dilakukan seperti dijelaskan sebelumnya. Parameter yang diukur adalah pertumbuhan bobot, panjang badan, dan sintasan, serta biomassa. Hasilnya dibandingkan dengan lama waktu perendaman 1 jam pada penelitian sebelumnya.

Analisis Ekspresi Gen SIBD (IGF-like), MIH, dan CypA

Ekspresi gen *single insulin binding domain* (SIBD), *moult inhibiting hormone* (MIH), dan *cyclophilin A* (CypA) diukur pada awal dan akhir penelitian. Sampel awal adalah PL-2 sebelum dilakukan perendaman rEIGH sebanyak 50 ekor, dan sampel akhir adalah PL-14 dengan dosis perendaman terbaik sebanyak 9 ekor dari 3 ulangan yang diambil secara acak, dalam kondisi segar dilakukan ekstraksi RNA. RNA total diekstraksi dari sampel sekitar 10-25 mg menggunakan bahan isogen (TAKARA, Japan) dengan metode sesuai prosedur dalam manual. RNA total dilarutkan dengan DEPC sebanyak 50 µL.

Sintesis DNA komplementer (cDNA) dilakukan menggunakan kit *Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads* (GE Healthcare, USA) dengan prosedur sesuai manual. Primer yang digunakan adalah oligo(dT3) (5'-gtaatcga

taactatagggcacgcgtggctgcacggccccgggctgg-tttttttttttttttt-3) konsentrasi 1 µg/3 µL sebanyak 3 µL per sampel. Hasil sintesis diencerkan dengan menambahkan air steril SDW sebanyak 50 µL.

Tingkat ekspresi setiap gen tersebut dari masing-masing sampel dianalisis secara kuantitatif menggunakan *real-time* PCR (qPCR) dengan primer spesifik (Tabel 1). Primer didesain berdasarkan sekuen yang diakses pada GenBank, yaitu SIBD dengan nomor aksesinya EU664996.1 (Castellanos *et al.*, 2008), MIH dengan nomor aksesinya DQ412566.1 (Chen *et al.*, 2007), CypA dengan nomor aksesinya EU164775.1 (Qiu *et al.*, 2009), β-aktin dengan nomor aksesinya AF300705.2 (Sun *et al.*, 2007).

Premix untuk setiap sampel *running* qPCR terdiri atas: 4 µL Evagreen (Solis BioDyne) yang berisi bahan-bahan reaksi PCR dan *fluorescent dye*; 1 µL primer *specific forward*; 1 µL primer *specific reverse*; 12 µL SDW; dan 2 µL template cDNA. Analisis qPCR dilakukan dengan mesin Rotor Gene (*Corbett research*) dengan program: proses pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus; proses denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik sebanyak 40 siklus; proses *annealing* pada suhu 62,9°C selama 30 detik sebanyak 40 siklus; proses ekstensi pada suhu 72°C selama 30 detik sebanyak 40 siklus; dan proses *melting* pada suhu 62,9°C sampai 99°C dengan perpindahan suhu setelah 5 detik. Data-data amplifikasi yang terekam diolah dengan metode Livak & Schmittgen (2011) untuk menghitung tingkat ekspresi gen, yang dinormalkan dengan β-aktin sebagai kontrol internal *loading* RNA dalam sintesis cDNA.

Tabel 1. Nama primer spesifik dan sekuen nukleotidanya

Table 1. Specific primer name and nucleotide sequence

Nama primer Primer name	Sekuen (urutan 5'-3') Sequence (5'-3')
Forward SIBD (SIBD-F)	AAATGGTACTGATTCCTGGGACAAG
Reverse SIBD (SIBD-R)	AGAATCATGAAACCTTGTCACAGGA
Forward MIH (mih1-F)	ATTATACACTCATGTATCGGCTGGC
Reverse MIH (mih-R)	AGAGGCTTGTCCCAACAACACTACAAT
Forward CypA (CypA-F)	CTGTAAAGTTTCAGAACATTCACCCC
Reverse CypA (CypA-R)	GAACACCTATCTTGTTTACCACCT
Forward β -aktin (Lvbac-F)	CCTCCACCATGAAGATCAAGATCAT
Reverse β -aktin (Lvbac-R)	CACTTCCTGTGAACAATTGATGGTC

Analisis Data

Data pertumbuhan dan sintasan dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam (Anova), dan jika terdapat pengaruh nyata dilanjutkan dengan uji Duncan. Ekspresi gen SIBD, CypA, dan MIH dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN BAHASAN

Pertumbuhan Bobot dan Panjang Badan

Pertumbuhan PL secara statistik berbeda nyata ($P < 0,05$) pada pengukuran hari ke-12 atau pada PL-14. Dari 5 dosis perlakuan perendaman, diperoleh hasil bahwa dosis *rEIGH* 15 mg/L memberikan pertumbuhan bobot badan tertinggi dengan nilai ($17,199 \pm 2,378$ mg) dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan 4 perlakuan lainnya serta kontrol (perendaman *pCold* dan tanpa perendaman) (Tabel 2). Dosis *rEIGH* 15 mg/L memberikan peningkatan bobot badan sekitar 37,77% lebih tinggi daripada kontrol tanpa perendaman (K) dan 77,27% lebih tinggi daripada kontrol perendaman *pCold* (K+).

Panjang post larva udang yang telah diberi perlakuan perendaman *rEIGH* dengan dosis 15 mg/L juga memberikan pertumbuhan panjang badan tertinggi dengan nilai ($1,768 \pm 0,018$ cm) dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan 4 perlakuan lainnya serta kontrol (perendaman dengan *pCold* dan tanpa perendaman) (Tabel 2). Dosis *rEIGH* 15 mg L⁻¹ memberikan peningkatan panjang badan sebesar 12,75% lebih tinggi dibanding kontrol tanpa perendaman (K) dan 19,22% lebih tinggi daripada kontrol dengan perendaman *pCold* (K+). Pertumbuhan bobot badan dan panjang badan post larva udang vaname pada kontrol tanpa perendaman (K) dan perendaman dengan *pCold* (K+) tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian protein *E. coli* tanpa *rEIGH* tidak berdampak terhadap pertumbuhan.

Hormon pertumbuhan secara langsung menstimulasi pertumbuhan melalui mekanisme metabolisme protein, lemak, karbohidrat, dan secara tidak langsung menstimulasi pembentukan *insulin growth factor* (IGF-1) di hati (Moriyama & Kawachi, 2001). Selanjutnya IGF-1

Tabel 2. Bobot badan, panjang badan, sintasan, dan biomassa post larva udang vaname yang direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang (*rEIGH*) dibandingkan dengan kontrol

Table 2. Body weight, body length, survivals, and biomass of white shrimp post larvae immersed in recombinant giant grouper growth hormone (*rEIGH*) compared with controls

Perlakuan <i>Treatment</i>	Bobot badan <i>Body weight (mg)</i>	Panjang badan <i>Body length (cm)</i>	Sintasan <i>Survival (%)</i>	Biomassa <i>Biomass (g)</i>
P1	11.988±1.661 ^a	1.568±0.068 ^a	88.067±3.348 ^b	15.827±2.151 ^a
P2	17.199±2.378 ^b	1.768±0.018 ^b	88.580±0.900 ^b	22.852±2.141 ^b
P3	12.404±2.750 ^a	1.525±0.130 ^a	88.333±0.900 ^b	16.459±3.790 ^a
P4	10.962±1.692 ^a	1.490±0.048 ^a	88.289±1.033 ^b	14.530±2.400 ^a
P5	12.494±0.523 ^a	1.578±0.028 ^a	87.890±2.607 ^b	16.484±1.177 ^a
K+	9.702±1.092 ^a	1.483±0.084 ^a	84.843±3.049 ^{ab}	12.313±0.945 ^a
K	12.484±1.821 ^a	1.568±0.097 ^a	80.933±5.354 ^a	15.061±1.299 ^a

Keterangan (Note):

Nilai ditampilkan dalam bentuk rerata dari 3 kali ulangan ± SD. Huruf *superscript* yang berbeda pada kolom yang sama mengindikasikan perbedaan pengaruh perlakuan berdasarkan uji lanjut Duncan ($P < 0,05$). P1: 150 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0,01% BSA; P2: 15 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0,01% BSA; P3: 1,5 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0,01% BSA; P4: 0,15 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0,01% BSA; P5: 0,015 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0,01% BSA; K+: Perendaman badan inklusi *pCold* tanpa sisipan GH + 0,01% BSA; K: Tanpa perendaman *rGH* (Values are shown as the mean of 3 replicates ± SD. Different superscript letters in the same column indicate differences in treatment effects by Duncan further test ($P < 0.05$). P1: 150 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0.01% BSA; P2: 15 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0.01% BSA; P3: 1.5 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0.01% BSA; P4: 0.15 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0.01% BSA; P5: 0.015 mg L⁻¹ *rEIGH* + 0.01% BSA; K+: Immersion *pCold* inclusion bodies without inserts GH +0.01% BSA; K: Without immersion of *rEIGH*)

menstimulasi pembelahan mitosis kondrosit dan pelepasan sulfat di dalam matriks tulang rawan sehingga terjadi pertumbuhan tulang-tulang (Bolander, 2004). Hormon pertumbuhan rekombinan yang masuk ke tubuh udang mekanismenya belum diketahui secara pasti berperan secara langsung atau tidak langsung, tetapi secara pasti telah menunjukkan peningkatan pertumbuhan baik bobot maupun panjang badan post larva udang vaname.

Dosis pemberian rGH harus tepat, karena jika kandungan IGF-1 berlebih dapat memberikan umpan balik negatif pada kelenjar untuk tidak mensekresi GH (Moriyama & Kawachi, 2001), dan jika kekurangan, maka pertumbuhan relatif lambat. Fenomena ini terlihat pada perlakuan P1 (dosis 150 mg L⁻¹ media) pertumbuhan lebih rendah daripada kontrol (K) walaupun tidak berbeda nyata (P>0,05). Pada dosis yang lebih rendah (P3: 1,5 mg L⁻¹ media dan P5: 0,015 mg L⁻¹ media) pertumbuhan sama dengan kontrol (K) dan perlakuan P4 (dosis 0,15 mg L⁻¹ media) pertumbuhan sama dengan kontrol (K+) atau lebih rendah dari kontrol (K).

Selanjutnya penelitian dikembangkan dengan lama waktu perendaman 2 dan 3 jam, serta waktu pengamatan sampai 18 hari. Hasil pengamatan dibandingkan dengan waktu perendaman 1 jam pada penelitian yang sama. Pada pengamatan hari ke-12 peningkatan bobot pada perendaman 2 jam dan 3 jam masih

rendah, yaitu masing-masing 0,73% dan 9,38%; tetapi peningkatan panjang badan lebih besar, yakni 7,2% untuk perendaman 2 jam dan 16% untuk perendaman 3 jam (Tabel 3).

Peningkatan bobot badan udang perlakuan 3 jam (62,21%) cukup tinggi setelah hari ke-18, sedangkan peningkatan panjang sebesar 12,29%. Angka tersebut 2,3 kali lebih besar dibandingkan dengan perendaman 2 jam yang hanya meningkat 26,99% untuk bobot (Tabel 3). Lama perendaman rEIGH sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan khususnya bobot udang. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penyerapan rGH ke dalam tubuh udang membutuhkan waktu cukup lama (3 jam) untuk mendapatkan hasil yang optimal. Hal ini besar kemungkinan karena kondisi eksoskeleton yang keras pada udang, sehingga penyerapannya lambat. Perendaman 3 jam dengan dosis 15 mg L⁻¹ ini hasilnya lebih tinggi daripada yang dilakukan oleh Sonnenchein (2001), yaitu dengan dosis 300 mg L⁻¹ dan lama perendaman 1 jam terjadi peningkatan bobot badan 38% setelah pemeliharaan 2 bulan, tetapi lama pemeliharaan dan rGH yang digunakan tidak sama, demikian juga jumlah udang yang direndam, lingkungan, dan metode pemeliharaan adalah tidak sama.

Selain dosis dan lama pemberian rGH, frekuensi perendaman rGH juga mempengaruhi peningkatan pertumbuhan pada udang. Frekuensi perendaman rGH 7 kali telah

Tabel 3. Peningkatan bobot dan panjang badan udang vaname setelah direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang (rEIGH) selama 2 dan 3 jam dibandingkan dengan lama perendaman 1 jam

Table 3. Increment of body weight and length of white shrimp after immersed in recombinant giant grouper growth hormone (rEIGH) for 2 and 3 hours compared to 1 hour immersion

	Lama waktu perendaman <i>Immersion time</i>	Peningkatan bobot <i>Body weight increment (%)</i>	Peningkatan panjang <i>Body length increment (%)</i>
Pengamatan hari ke-12	2 jam (<i>hour</i>)	0.73	7.20
<i>Observed at day 12</i>	3 jam (<i>hour</i>)	9.38	16.00
Pengamatan hari ke-18	2 jam (<i>hour</i>)	26.99	10.05
<i>Observed at day 18</i>	3 jam (<i>hour</i>)	62.21	12.29

Keterangan (*Note*):

Perendaman dilakukan selama 1, 2, dan 3 jam pada stadia PL-2. Nilai tersebut merupakan rata-rata dari 3 ulangan (*Immersion was performed for 1, 2, and 3 hours at PL-2 stage. This value was an average of 3 replications*)

dilakukan oleh Santiesteban *et al.* (2010) pada post larva udang vaname dengan dosis 100 µg rtiGH (kemurnian sekitar 95%) per liter media perendaman setiap 3 hari sekali, dapat meningkatkan pertumbuhan bobot sebesar 42,4% pada pengamatan hari ke-24. Jika disetarakan dengan total protein badan inklusi yang mengandung rGH, dosis rtiGH yang digunakan untuk perendaman adalah 7 mg per liter media. Dengan dosis rGH lebih tinggi (15 mg L⁻¹) dan lama perendaman 3 jam, hasilnya lebih tinggi (terjadi peningkatan 62,21% dibanding 1 jam), sedangkan Santiesteban *et al.* (2010) dengan dosis 7 mg L⁻¹ dan lama perendaman 1 jam, terjadi peningkatan 42,2% setelah 24 hari pemeliharaan.

Sintasan dan Biomassa

Dengan pemberian rEIGH yang dilakukan melalui perendaman terbukti efektif dapat meningkatkan ketahanan tubuh dalam menghadapi lingkungan pemeliharaan, sehingga udang yang bertahan hidup (*survive*) pada 5 perlakuan berbeda nyata (P<0,05) dengan kontrol tanpa perendaman (K), sedangkan antara 5 perlakuan dan perendaman dengan pCold (K+) tidak berbeda nyata (P>0,05). Selanjutnya antara kontrol K dan K+ tidak berbeda nyata (P>0,05) (Tabel 2). Perlakuan P2 (dosis 15 mg L⁻¹ media) memberikan peningkatan sintasan sebesar 9,45% dibandingkan dengan kontrol K.

Dari hasil penelitian ternyata dengan pemberian rGH mampu meningkatkan imunitas, sehingga sintasan meningkat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Castellanos *et al.* (2008) bahwa protein SIBD dari *L. vannamei* yang mempunyai kemiripan tinggi dengan IGFBP ditemukan pada hemosit, mengandung protein yang berkaitan dengan respons imun. Selanjutnya Sonnenschein (2001) menyatakan bahwa hormon pertumbuhan rekombinan sapi secara oral untuk yuwana udang pada budidaya mampu meningkatkan kekebalan udang dan juga meningkatkan pertumbuhan.

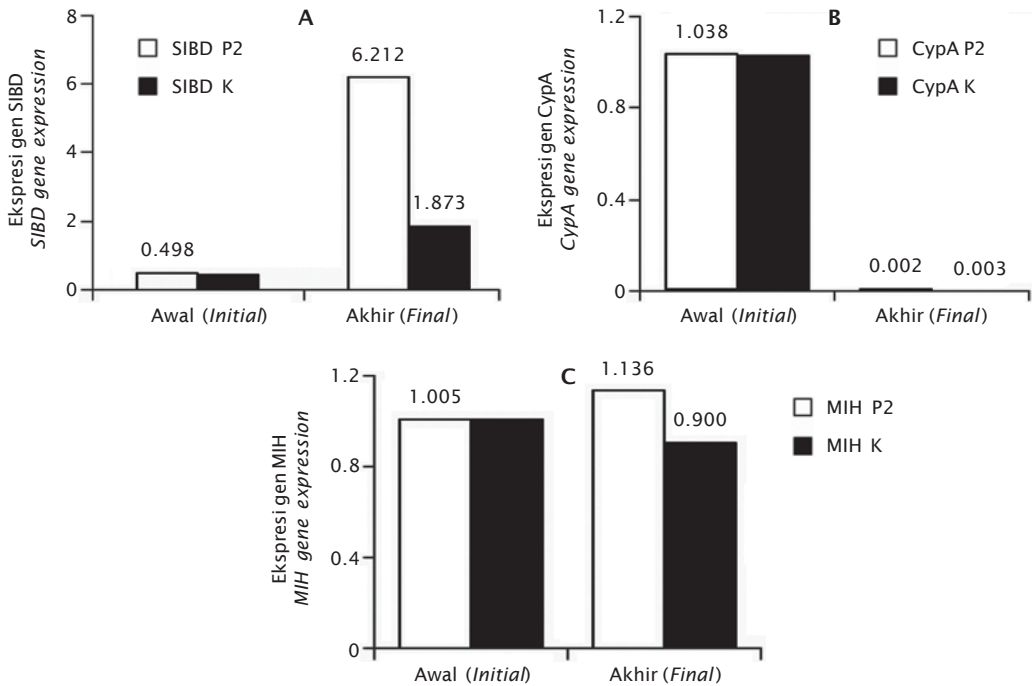
Sebagai tolok ukur produksi adalah biomassa. Perlakuan perendaman 15 mg L⁻¹ media (P2) menunjukkan biomassa (22,852 g) tertinggi, sedangkan kontrol sebesar 15,061 g (Tabel 2). Biomassa udang yang diberi perlakuan perendaman 15 mg L⁻¹ media mengalami peningkatan sebesar 51,730% dibandingkan dengan kontrol (K). Peningkatan biomassa pada perlakuan P2 lebih tinggi daripada peningkatan bobot, hal ini disebabkan

kan sintasan pada perlakuan P2 juga lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (K). Selanjutnya biomassa semua perlakuan pada akhir penelitian juga menunjukkan tren yang sama dengan pertumbuhan bobot dan panjang udang, karena sintasan pada semua perlakuan juga lebih tinggi dari kontrol (K).

Ekspresi Gen SIBD, CypA, dan MIH

Ekspresi gen SIBD pada udang yang telah diberi perlakuan rEIGH dengan dosis 15 mg L⁻¹ media (P2) meningkat sekitar 12,5 kali dibandingkan sebelum perlakuan (*level* 0,498) (Gambar 2A), sedangkan ekspresi gen SIBD kontrol tanpa perendaman (K) pada akhir penelitian mengalami peningkatan sekitar 3,7 kali. Dengan demikian, perlakuan rEIGH menstimulir ekspresi gen SIBD sebesar 3,3 kali dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan ekspresi gen SIBD sebesar 3,3 kali tersebut sejalan dengan peningkatan pertumbuhan bobot sebesar 37,77% dan peningkatan panjang badan sebesar 12,75%. Dengan demikian SIBD berperan penting dalam induksi pertumbuhan pasca perlakuan rEIGH, dan diduga melibatkan efek tidak langsung seperti halnya pada ikan (IGF-1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Bolander (2004) bahwa pertumbuhan linier skeleton diperantarai oleh IGF-1, selanjutnya IGF-1 menstimulir pembelahan mitosis kondrosit dan pelepasan sulfat di dalam matriks tulang rawan sehingga terjadi pertumbuhan tulang.

Tingkat ekspresi gen CypA pada perlakuan 15 mg L⁻¹ media (P2) menunjukkan penurunan dari 1,038 menjadi 0,002 pada akhir penelitian (hari ke-12). Hal yang sama juga terjadi pada kontrol tanpa perendaman (K), terjadi penurunan tingkat ekspresi dari 1,038 menjadi 0,003 (Gambar 2B). Tangprasittipap *et al.* (2010) menemukan *cyclophilin A* (CypA) mempunyai korelasi yang tinggi terhadap bobot badan udang *P. monodon*. Untuk itu, dilakukan identifikasi dan pengukuran ekspresi gen CypA dan ternyata dengan penambahan rEIGH tidak menunjukkan adanya aktivitas CypA, bahkan ekspresi gen menurun dibandingkan pada awal sebelum perlakuan. Hasil identifikasi *growth hormone* (GH) pada krustase belum jelas, tetapi beberapa penelitian pemberian rGH pada udang memberikan hasil nyata terhadap peningkatan pertumbuhan (Toullec *et al.*, 1991; Sonnenschein, 2001; Santiesteban *et al.*, 2010).



Gambar 2. Tingkat ekspresi gen SIBD (*single insulin binding domain*) (A), CypA (*cyclophilin A*) (B), dan MIH (*moult inhibiting hormone*) (C) pada awal (sebelum perendaman) dan 12 hari setelah perendaman hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang (*rEIGH*) dosis 15 mg L^{-1} media (P2) dan tanpa perendaman (K). mRNA diekstraksi dari 50 ekor PL-2 (awal) dan 9 ekor PL-14 (akhir) dari populasi 3 ulangan. Tingkat ekspresi gen dianalisis menggunakan metode *real-time* PCR dan dinormalisasi dengan ekspresi gen β -aktin

Figure 2. Gene expression level of SIBD (*single insulin binding domain*) (A), CypA (*cyclophilin A*) (B), and MIH (*moult inhibiting hormone*) (C) at early (*before immersion*) and 12 days after immersion in recombinant giant grouper growth hormone (*rEIGH*) at dose 15 mg L^{-1} media (P2) and without immersion (K). The mRNA was extracted from 50 PL-2 (early) and 9 PL-14 (end) of the population of 3 replications. Gene expression level was analyzed using *real-time* PCR and normalized to β -actin gene expression

Tingkat ekspresi gen MIH pada perlakuan perendaman 15 mg L^{-1} media (P2) terlihat ada kenaikan 13%, sedangkan pada kontrol tanpa perendaman (K) terjadi penurunan dari 1,005 menjadi 0,900 (Gambar 2C). Hal ini menunjukkan bahwa perendaman *rEIGH* menginduksi ekspresi MIH. *Moulting* memiliki peran penting dalam pertumbuhan, ecdysteroid merupakan hormon yang bertanggung jawab dalam pertumbuhan, perkembangan dan reproduksi yang disintesis organ X, sedangkan organ Y mensintesis MIH yang berperan menghambat sintesis ecdysteroid (Claerhout *et al.*, 1996). Pengukuran sesaat pada MIH memang tidak dapat mencerminkan aktivitas pertumbuhan dalam jangka waktu tertentu, karena MIH ini meningkat pada saat akan terjadi *moulting*.

Dengan penggunaan *rEIGH* ini produksi budidaya diduga akan meningkat dan lebih efisien, karena dari penelitian ini setelah perendaman 12 hari dari PL-2 sudah dapat meningkatkan pertumbuhan bobot sebesar 37,77%; panjang badan 12,75%; sintasan 9,45%; dan biomassa 50,73%. Dengan kondisi tersebut stadia benih udang yang siap ditebar ke tambak dapat dipersingkat pada stadia sebelum PL-14 dengan sintasan yang lebih tinggi, sehingga produktivitas benih meningkat dan lebih efisien. Di samping itu, perlu kajian lebih lanjut pemeliharaan udang di tambak dengan atau tanpa pemberian *rGH*, karena jika terjadi peningkatan biomassa di tambak akan sangat membantu petambak dalam meningkatkan produksinya. Pemberian

rGH pada pembesaran udang telah dilakukan oleh Sonnenschein (2001) dan terbukti dapat meningkatkan bobot 38% dan panjang badan 11% setelah pemberian hormon pertumbuhan sapi (bST) sebanyak 300 mg L⁻¹ media dalam sekali perendaman pada yuwana udang (bobot 90 mg) dan dipelihara sampai 2 bulan. Dari penelitian tersebut dapat dihitung efisiensi produksi minimal sebesar 38%. Selain perendaman, metode pemberian rGH dapat dikombinasi dengan cara *oral* lewat pakan. Kombinasi ini sangat mungkin dilakukan pada udang, karena setelah post larva udang di-rendam rGH dapat dilanjutkan dengan pemberian lewat pakan pada periode pembesaran di tambak. Handoyo (2012) telah melakukan kombinasi metode perendaman dengan dosis 12 mg rEIGH L⁻¹ media pada stadia *glass eel* ikan sidat dan lewat pakan dengan dosis 30 mg rEIGH kg⁻¹ pakan pada stadia *elver* ikan sidat, memberikan peningkatan biomassa panen sebesar 102,9% dibandingkan dengan kontrol.

KESIMPULAN

Pemberian rEIGH dengan metode perendaman berdampak pada pertumbuhan post larva udang vaname pada stadia PL-2-PL-14. Pertumbuhan terbaik diperoleh pada dosis 15 mg L⁻¹ media. Peningkatan bobot, panjang badan, dan sintasan, serta biomassa pada perlakuan 15 mg L⁻¹ media berturut-turut adalah sebesar 37,77%; 12,75%; 9,45%; dan 50,73% dibandingkan dengan kontrol. Hasil pengukuran ekspresi gen SIBD (IGF-like) membuktikan bahwa pemberian rEIGH dengan dosis 15 mg L⁻¹ media mampu menginduksi ekspresi SIBD sebesar 3,32 kali lebih besar dibandingkan dengan kontrol, dan menginduksi MIH sebesar 13%, sedangkan ekspresi gen CypA tidak terinduksi.

DAFTAR ACUAN

Acosta, J., Morales, R., Morales, A., Alonso, M., & Estrada, M.P. 2007. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotechnology Lett.*, 29: 1,671-1,676.

Alimuddin, Lesmana, I., Sudrajat, A.O., Carman, O., & Faizal, I. 2010. Production and bioactivity potential of three recombinant growth hormones of farmed fish. *Indonesian Aquaculture Journal*, 5(1): 11-16.

Alimuddin, Handoyo, B., & Utomo, N.B.P. 2012. 104 Inovasi Indonesia 2012. Institut Pertanian Bogor.

Bolander, F.F. 2004. *Molecular Endocrinology*, 3rd ed. Elsevier Academic Press, London, 617 pp.

Baldaia, L., Porcheron, P., Coimbra, J., & Cassier, P. 1984. Ecdysteroids in the shrimp *Palaemon Serratus*: relations with molt cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55: 437-443.

Castellanos, M, Jiménez-Vega, F., & Vargas-Albores, F. 2008. Single IB domain (SIBD) protein from *Litopenaeus vannamei*, a novel member for the IGFBP family. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, 3: 270-274.

Chen, H.Y., Watson, R.D., Chen, J.C., Liu, H.F., & Lee, C.Y. 2007. Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 151: 72-81.

Claerhout, T., Bendena, W., Tobe, S.S., & Borst, D.W. 1996. Characterization of methyl transferase activity in the mandibular organ of the American lobster, *Homarus americanus*. *Biol. Bull.*, 191: 304-304.

Funkenstein, B., Dyman, A., Lapidot, Z., de Jesus-Ayson, E.G., Gertler, A., & Ayson, F.G. 2005. Expression and purification of a biologically active recombinant rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. *Aquaculture*, 250: 504-515.

Gutiérrez, A., Nieto, J., Pozo, F., Stern, S., & Schoofs, L. 2007. Effect of insulin/IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153: 170-175.

Handoyo, B. 2012. *Respons benih ikan sidat terhadap hormon pertumbuhan rekombinan ikan kerapu kertang melalui perendaman dan oral*. Tesis. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Hardiantho, D., Alimuddin, Prasetyo, A.E., Yanti, D.H., & Sumantadinata, K. 2011. Aplikasi Rekombinan Growth Hormon (rGH) Ikan Mas Pada Ikan Nila melalui Pakan Buatan. Makalah yang disampaikan dalam Pertemuan Broodstock Center Nila & Temu Koordinasi Perekayasa Kementerian Kelautan dan Perikanan pada tanggal 15-17 November 2011.

Irmawati, Alimuddin, Zairin, M., Suprayudi, M.A., & Wahyudi, A.T. 2012. Peningkatan laju pertumbuhan benih ikan gurame (*Osphronemus gouramy* Lac.) yang di-rendam dalam media yang mengandung

- hormon pertumbuhan ikan mas. *Jurnal Iktiologi Indonesia (in press)*.
- Jeh, H.S., Kim, C.H., Lee, H.K., & Han, K. 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *Journal Biotechnology*, 60: 183-193.
- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, function and comparative aspects. *Experientia*, 48: 439-447.
- Li, Y., Bai, J., Jian, Q., Ye, X., Lao, H., Li, X., Luo, J., & Liang, X. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 329-341.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Moriyama, S. & Kawauchi, H. 2001. Growth Regulation by growth hormone and insulin-like growth factor-I in teleosts. *Otsuchi Marine Science*, 26: 23-27.
- Poen, S. 2009. *Cloning, over-expression and characterization of growth hormone from stripped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*. Tesis. Master of Science (Genetic Engineering) Graduate School, Kasetsart University.
- Promdonkoy, B., Warit, S., & Panyim, S. 2004. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (*Pangasionodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 26: 649-653.
- Qiu, L., Jiang, S., Huang, J., Wang, W., Zhu, C., & Su, T. 2009. Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 115-121.
- Santiesteban, D., Martín, L., Arenal, A., Franco, R. & Sotolongo, J. 2010. Tilapia growth hormone binds to a receptor in brush border membrane vesicles from the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 306: 338-342.
- Syazili, A., Irmawati, Alimuddin, & Sumantadinata, K. 2011. Kinerja pertumbuhan dan kelangsungan hidup juvenil ikan gurame direndam hormon pertumbuhan rekombinan dengan frekuensi berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10 (in press).
- Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S., & Kawauchi, H. 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4,306-4,310.
- Sonnenschein. 2001. Method of Enhancing Growth and Immunity of Shrimp Larvae Using Recombinant Bovine Growth Hormone. WIPO Patent Application WO/2005/115166.
- Sun, P.S., Soderlund, M., Venzon, N.C. Jr, Ye, D., Lu, Y. 2007. Isolation and characterization of two actins of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Mar. Biol.*, 151: 2,145-2,151.
- Tangprasittipap, A., Tiensuwan, M., & Withyachumnarnkul, B. 2010. Characterization of candidate genes involved in growth of black tiger shrimp *Penaeus Monodon*. *Aquaculture*, 307: 150-156.
- Toullec, J.Y., Le Moullac GJ, Gerad, C., Van Wormhoudt, A. 1991. Immunoreactive human growth hormone like peptides in tropical Penaeids and the effect of dietary hGH on *Penaeus vannamei* larval development. *Aquat. Living Resour.*, 4: 125-132.
- Tsai, H.J., Hsieh, M.H., & Kuo, J.C. 1997. *Escherichia coli* produced fish growth hormone as a feed additive to enhance the growth of juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *J. Appl. Ichthyol.*, 13: 78-82.
- Utomo, D.S.C. 2010. *Produksi dan Uji Bioaktivitas Protein Rekombinan Hormon Pertumbuhan Ikan Mas*. Tesis. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Walker, J.M. 2002. *The Protein Protocols Handbook*. Second Edition. Human Press Inc., Totowa New Jersey.