

Hamdan Syakuri

By Diah Ayu Satyari Utami

ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN ANALISIS EKSPRESI GEN PENGKODE *GROWTH HORMONE* PADA IKAN SIDAT *Anguilla bicolor*

ABSTRAK

Gen hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) perlu dipelajari untuk mendukung domestikasi ikan sidat *Anguilla bicolor* di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen pengkode GH serta menganalisis ekspresinya pada sampel ikan sidat *A. bicolor*. Primer untuk amplifikasi gen GH ikan sidat *A. bicolor* didesain berdasarkan sekuen gen GH dari beberapa spesies ikan sidat lain yang tersedia di GenBank. Sampel cDNA hipofisa dan otak ikan sidat digunakan untuk amplifikasi gen GH. Hasil amplifikasi disekuensing dan hasilnya dianalisis menggunakan analisis BLAST, *multiple sequences alignment*, *hormon signature*, dan filogenetik. Analisis ekspresi gen GH dilakukan menggunakan teknik *realtime PCR* dengan metode delta-delta CT pada 14 sampel ikan sidat ($23,1 \pm 19,6$ g; $24,5 \pm 4,2$ cm). Fragmen DNA sepanjang 486 bp berhasil diamplifikasi dan disekuensing. Sekuen gen GH *A. bicolor* memiliki similaritas nukleotida sebesar 98,49-99,14% jika dibandingkan dengan gen GH ikan sidat *A. anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica*. Sekuen parsial tersebut secara *in silico* diketahui mengkode bagian dari protein GH sepanjang 155 asam amino (aa). Sekuen asam amino protein GH *A. bicolor* sangat mirip dengan sekuen spesies ikan sidat lain dengan hanya tiga perbedaan asam amino dan membentuk satu percabangan pada pohon filogenetik. Tingkat ekspresi gen GH pada sampel ikan sidat memiliki variasi yang tinggi. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk studi selanjutnya khususnya berkaitan dengan peran gen GH dalam pertumbuhan ikan sidat *A. bicolor*.

KATA KUNCI: *Anguilla bicolor*; ekspresi gen; hormon pertumbuhan; RT-PCR; sekuen gen

ABSTRACT: *Isolation, Identification, and Analysis of Growth Hormone Coding Genes Expression in Eel Anguilla bicolor*

The growth hormone (GH) gene needs to be studied to support the domestication of the *Anguilla bicolor* eel in Indonesia. This study aimed to isolate and identify the GH coding gene and analyze its expression in samples of the eel *A. bicolor*. Primers for amplification of the GH gene of *A. bicolor* eels were designed based on GH gene sequences from several other eel species available in GenBank. Pituitary and brain cDNA samples of eel were used for GH gene amplification. The amplification results were sequenced and the results were analyzed using BLAST analysis, multiple sequence alignment, hormone signature, and phylogenetic analysis. The GH gene expression analysis was carried out using the real-time PCR technique with the delta-delta CT method on 14 eel samples (23.1 ± 19.6 g; 24.5 ± 4.2 cm). The 486 bp DNA fragment was successfully amplified and sequenced. The GH gene sequence of *A. bicolor* has a nucleotide similarity of 98.49-99.14% when compared with the GH gene of other eel species *A. anguilla*, *A. australis*, and *A. japonica*. This partial sequence was found in silico to code 155 amino acids (aa) GH protein. The amino acid sequence of the *A. bicolor* GH protein is very similar to that of other eel species with only three amino acid differences and forms one branch on the phylogenetic tree. The expression level of the GH gene in eel samples had high variations. The results of this study could be a basis for further studies, especially regarding the role of the GH gene in the growth of the eel *A. bicolor*.

KEYWORDS: *Anguilla bicolor*; expression of gene, growth hormone; RT-PCR; sequence of gene

PENDAHULUAN

Ikan sidat *Anguilla bicolor* merupakan ikan yang sedang dalam proses domestikasi menjadi komoditas perikanan budidaya di Indonesia. Jenis ikan sidat ini banyak ditemukan di perairan selatan Jawa, Sumatera, dan Sulawesi (Fahmi, 2015; Fahmi & Hirnawati, 2010). Tahap budidaya ikan sidat yang sudah dapat dilakukan adalah tahap pendederan dan pembesaran. Tahap ini menggunakan benih ikan sidat yang berasal dari alam, sehingga budidaya ikan sidat sangat tergantung pada keberhasilan usaha penangkapan dan ketersediaannya di alam (Setijanto *et al.*, 2014). Tahap domestikasi ini berada pada level 2, di mana baru sebagian dari siklus hidup ikan yang dapat dilakukan dalam lingkungan terkontrol (Teletchea, 2021; Teletchea & Fontaine, 2014). Untuk mendukung keberhasilan domestikasi ikan sidat, beberapa aspek telah dipelajari antara lain adalah biologi reproduksi (Rachmawati *et al.*, 2017), infeksi parasit (Pratama *et al.*, 2019), teknik budidaya (Affandi *et al.*, 2013; Marlina & Handayani, 2022; Yolla *et al.*, 2020), dan pakan (Arief *et al.*, 2011). Kajian tersebut umumnya bertujuan untuk mempelajari perkembangan gonad, infeksi penyakit, dan pertumbuhan ikan sidat di lingkungan terkontrol. Berkaitan dengan pertumbuhan, aspek yang perlu dikaji adalah gen pengkode hormon pertumbuhan.

Hormon pertumbuhan atau *growth hormone* (GH) memiliki peran penting dalam pertumbuhan hewan termasuk ikan, terutama melalui poros GH-*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (Ndandala *et al.*, 2022). Hormon yang diproduksi dalam kelenjar *pituitary* (hipofisa) ini saat melekat pada *growth hormone receptor* (GHR) pada sel target yang akan memicu produksi dan sekresi IGF-1 (Dehkhoda *et al.*, 2018). *Growth hormone* memiliki peran penting dalam pembentukan tulang dan otot, metabolisme, dan pembentukan serta perbaikan jaringan tubuh (Dehkhoda *et al.*, 2018; Rotwein, 2020). Pada ikan, fungsi GH di antaranya adalah berkaitan dengan metabolisme, sistem imun, osmoregulasi, reproduksi, neuroendokrin dan neural, serta tingkah laku (Jönsson & Björnsson, 2002). Pada beberapa ikan teleostei, GH telah

terbukti berkaitan dengan peningkatan laju pertumbuhan spesifik untuk panjang dan berat tubuh. ¹ Peningkatan laju pertumbuhan tersebut disebabkan karena peningkatan nafsu makan dan efisiensi konversi pakan (Jönsson & Björnsson, 2002).

Kajian tentang gen GH pada ikan ¹ sidat masih sangat jarang dan umumnya terbatas pada ikan sidat Jepang *Anguilla japonica*, ikan sidat Eropa *Anguilla anguilla*, dan ikan sidat Australia *Anguilla australis* (Nguyen *et al.*, 2022; Yamaguchi *et al.*, 1987). Karakteristik molekuler protein GH ¹ telah dideskripsikan dari *A. japonica* (Yamaguchi *et al.*, 1987). Ekspresi gen hormon pertumbuhan pada ikan sidat tersebut telah diamati pada saat perkembangan larva dan ekspresinya terdeteksi mulai 6 hari setelah menetas (Ozaki *et al.*, 2006). Selain itu tingkat ekspresi gen GH juga telah dipelajari pada perkembangan larva ikan sidat Eropa dan dilaporkan berkaitan dengan temperatur pemeliharaan (Politis *et al.*, 2017). Sampai saat ini studi tentang gen GH pada *A. bicolor* masih sebatas pada analisis ekspresinya terkait pemberian kromium pikolinat melalui pakan (Nugrayani *et al.*, 2023). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi gen pengkode GH serta menganalisis ekspresinya pada ikan sidat *A. bicolor*.

BAHAN DAN METODE

Desain Primer Gen *Growth Hormone* Ikan Sidat

Primer gen GH ikan sidat *A. bicolor* dirancang berdasarkan sekuen gen GH ikan sidat yang terdapat di GenBank, yaitu dari *A. japonica* (M24066, AY616666), *A. anguilla* (AY148493), dan *A. australis* (HQ436341). Pensejajaran sekuen dilakukan menggunakan Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) untuk memperoleh daerah yang lestari (*conserve*). Primer dirancang di daerah lestari tersebut dengan menggunakan perangkat lunak Primer 3 versi 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Karakteristik primer tersebut diuji untuk mengetahui peluang terbentuknya struktur melingkar (*hairpin*), *self-dimer*,

dan *hetero-dimer* menggunakan perangkat lunak OligoAnalyzer versi 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). Prosedur ini menghasilkan tiga primer, yaitu ghAF1: 5`GGTCTTACTGGTCAGCTTCT 3`, ghAF2: 5`GCTTTCTCAAACAGCCTGAT 3`, dan ghAR: 5`GCATCGTTCCTAAGGTGTAC 3`. Kombinasi primer ghAF1 dan ghAR memiliki target sekitar 486 bp dan kombinasi primer ghAF2 dan ghAR memiliki target sekitar 173 bp.

Sampel untuk Identifikasi Gen *Growth Hormone*

Sampel ikan sidat stadia elver (sekitar 15 g) diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di wilayah Cilacap dan dibawa dalam kondisi hidup ke Laboratorium Riset, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman. Sampel hipofisa dan otak kemudian diambil dari ikan sidat dengan prosedur sebagai berikut: 1) ikan sidat dimatikan dengan memotong kepala; 2) bagian kepala ikan sidat dibedah secara horizontal, 3) otak dan ¹hipofisa diambil dan dimasukkan ke *microtube* 1,5 mL berisi 500 μ L *RNA Later* (Ambion), dan 4) sampel didiamkan pada temperatur ruang selama 30 menit, selanjutnya diinkubasi dalam *refrigerator* (4°C) selama 24 jam setelah itu disimpan dalam *freezer* (-20°C) sampai dilakukan isolasi RNA. Prosedur preservasi sampel menggunakan *RNA later* ini mengikuti protokol yang menyertai produk (Ambion).

Sampel untuk Analisis Ekspresi *Growth Hormone*

Sebanyak 14 ikan sidat stadia elver ($23,1 \pm 19,6$ g; $24,5 \pm 4,2$ cm) diambil dari hasil pemeliharaan selama dua bulan dalam sebuah kolam terpal sirkuler dengan diameter 2 m. Kolam berisi air dengan ketinggian 40 cm dan dilengkapi dengan *aerator*. Ikan sidat yang dipelihara tersebut diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di Kabupaten Cilacap. Ikan sidat diberi pakan berupa pakan pasta dengan kandungan protein 40% pada pagi dan sore hari

sebanyak 3% bobot tubuh per hari. Di akhir pemeliharaan, setiap individu ikan sidat diukur panjangnya, ditimbang beratnya, dimatikan, dan dibedah bagian kepalanya. Sampel hipofisa dari setiap ikan sidat diambil dan dipreservasi menggunakan RNA *later* sesuai dengan prosedur yang ada (Ambion).

Isolasi RNA

Sampel otak (sekitar 6 mg) dan total hipofisa ikan sidat diambil dari RNA *later* dengan menggunakan pinset kemudian dimasukkan ke *microtube* volume 1,5 mL. Sampel total RNA diisolasi menggunakan *Pure Link RNA Mini-Kit* sesuai dengan petunjuk pemakaiannya (Ambion). Sampel dimasukkan dalam 600 μ L *lysis buffer* yang telah ditambahkan 6 μ L β -*Mercaptoethanol* pada *microtube* volume 1,5 mL lalu sampel dihancurkan dengan *micropestle* dan disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan sebanyak 500 μ L dimasukkan dalam *microtube* volume 1,5 mL, lalu ditambahkan 500 μ L *ethanol* 70%, kemudian dihomogenkan. Sampel sebanyak 500 μ L dipindahkan ke dalam *spin cartridges* (tahap tersebut diulangi sampai semua larutan dimasukkan pada *spin cartridges*) kemudian disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Larutan pada tabung penampungan dibuang dan ditambahkan 600 μ L *wash buffer I* kemudian disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm, *collective tube* diganti dan ditambahkan *wash buffer II* sebanyak 500 μ L lalu disentrifugasi kembali selama 15 detik dengan kecepatan 12.000 rpm (diulang sebanyak satu kali). Larutan yang berada pada *collection tube* dibuang, lalu sentrifugasi kembali. *Spin cartridges* diletakkan pada *recovery tube* dan ditambahkan *RNase-Free Water* sebanyak 30 μ L lalu diinkubasi 1 menit kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Sampel RNA kemudian disimpan pada suhu -80°C hingga proses berikutnya.

DNase Treatment dan Sintesis cDNA

Kontaminasi DNA pada sampel RNA ¹ dihilangkan menggunakan *DNase I-RNase Free* sesuai petunjuk pemakaiannya (Thermo Scientific). Sebanyak 10 μ L *mix DNase treatment* yang terdiri atas: 2 μ L RNA; 1 μ L 10x *reaction buffer with* MgCl₂; 2 μ L *DNase I-RNase Free*; 5 μ L *nuclease-free water* ¹ dalam tabung PCR 0,2 mL diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C. Inaktivasi DNase dilakukan dengan menambahkan 1 μ L 50 mM EDTA dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Sampel RNA untuk isolasi dan identifikasi gen digunakan sebagai *template* sintesis cDNA, sedangkan sampel RNA untuk analisis ekspresi digunakan sebagai *template* dalam *one step realtime RT-PCR*.

Sampel RNA setelah tahap *DNase treatment* digunakan untuk menyintesis cDNA menggunakan *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Sebanyak 4 μ L 5x *Reaction Buffer*, 1 μ L *RiboLock RNase Inhibitor*, 2 μ L 10 mM dNTP mix, 1 μ L *RevertAid* dimasukkan dalam *tube* PCR, lalu ditambahkan 2 μ L sampel RNA produk *DNase treatment*, 1 μ L *random hexamer primer*, 9 μ L *nuclease-free water*, kemudian dihomogenisasi dengan *vortex* dan *spin down*. Sampel diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan suhu 40°C selama 60 menit, dan diakhiri pada 70°C selama 5 menit kemudian sampel disimpan dalam *freezer* (-20°C).

Amplifikasi Gen *Growth Hormone* dengan Teknik RT-PCR

Amplifikasi gen GH dilakukan dengan *Mytaq Hot Start Red PCR Master Mix* (2x) sesuai protokol (Bioline) dengan pasangan primer ghAF1 dan ghAR atau pasangan primer ghAF2 dan ghAR. Sebagai kontrol, amplifikasi juga dilakukan pada gen pengkode beta-aktin dengan primer ¹ BA-F1 (5' TGACGGACAGGTCATCACC 3') dan BA-R1 (5' CTCATCGTACTCCTGCTTGC 3') dengan target panjang produk 364 bp.

Amplifikasi dilakukan dengan total volume 50 μL yang terdiri atas *PCR Master Mix* (2x) sebanyak 25 μL ; *forward primer* 1 μL (10 pmol/ μL); *reverse primer* 1 μL (10 pmol/ μL); *nuclease-free water* 21 μL ; dan *template* (cDNA) 2 μL . Homogenisasi dilakukan dengan *vortexing* dan *spinning down*. Setelah itu, larutan dimasukkan pada mesin PCR (Primus 25 Thermocycler, Peqlab). Siklus temperatur yang digunakan adalah suhu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus: denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 30 detik, dan *extension* tambahan 72°C selama 5 menit.

Elektroforesis Produk Amplifikasi

Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 2% yang diberi *SYBR safe DNA gel stain* (Invitrogen) dalam buffer TBE 1X. Sampel hasil amplifikasi dan *DNA Ladder* dimasukkan pada sumuran dalam agarose gel menggunakan *micropipette* sebanyak 5 μL . Alat elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt dalam waktu sekitar 30 menit atau sampel mencapai 2/3 dari agarose gel. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan *UV-transilluminator* dan diambil gambarnya.

Analisis sekuen Gen GH

Sampel hasil PCR beserta primer ghAF1 dan ghAR dikirim ke PT. Genetika Sains Indonesia untuk dilakukan sekuensing dengan *ABI dye terminator chemistry* di First BASE Laboratories SDN BHD. Hasil dari sekuensing dievaluasi dan disatukan untuk memperoleh sekuen konsensus dengan menggunakan aplikasi *BioEdit* (Hall, 1999). Selanjutnya sekuen gen GH ikan sidat dianalisis menggunakan analisis BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Sekuen gen GH diterjemahkan secara *in silico* ke dalam sekuen asam amino menggunakan <https://web.expasy.org/translate/> (Gasteiger *et al.*, 2003). Identifikasi *hormone signature*

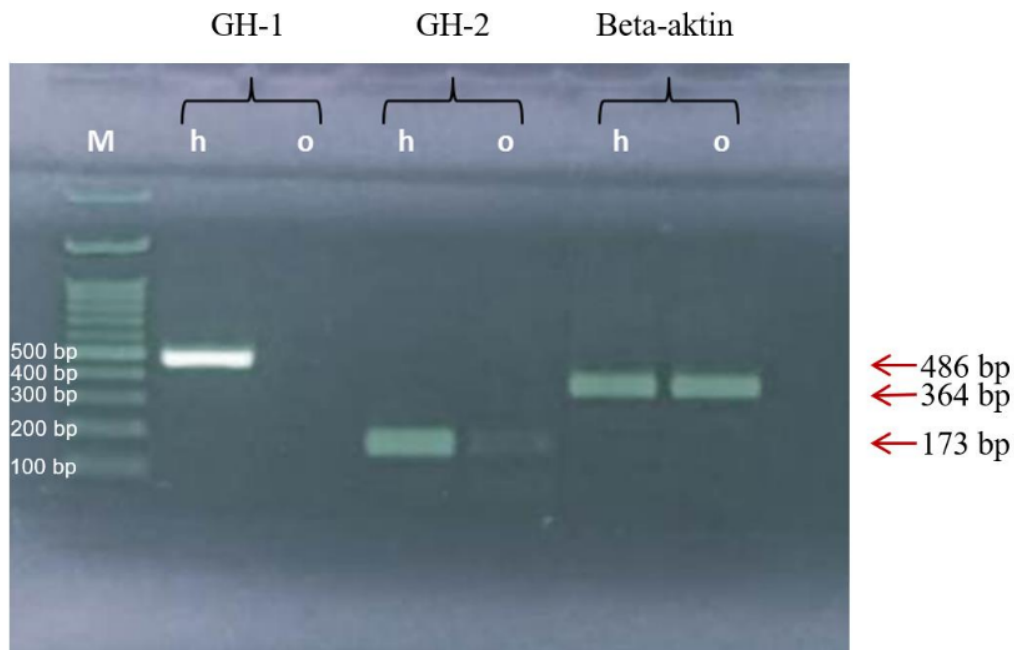
dilakukan menggunakan *database prosite* pada <https://prosite.expasy.org> (Hulo *et al.*, 2006). Hasil yang diperoleh kemudian digunakan dalam analisis *Multiple Sequences Alignment* dengan Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014), dan analisis filogenetik menggunakan <https://www.phylogeny.fr/> (Dereeper *et al.*, 2008).

Analisis Ekspresi GH dengan *One Step Realtime RT-PCR*

Tingkat ekspresi gen GH pada hipofisa diukur dengan metode delta-delta Ct dengan gen beta- aktin sebagai acuan internal menggunakan *one step realtime RT-PCR* dengan alat *Line-gene K Real-time PCR Detection System* (Bioer Technology). Bahan yang digunakan adalah *superscript platinum one step realtime PCR kit* (Invitrogen). Prosedur PCR dilakukan dengan mengikuti petunjuk penggunaan. *Master Mix* (2x) sebanyak 5 μL ; *forward primer* 0,2 μL (10 pmol/ μL); *reverse primer* 0,2 μL (10 pmol/ μL); *nuclease-free water* 4,2 μL ; dan *template* (RNA) 0,4 μL dicampurkan dalam tabung PCR 0,2 mL sehingga diperoleh larutan sebanyak 10 μL . Homogenisasi dilakukan dengan *vortexing* dan *spinning down*. Setelah itu, larutan dimasukkan pada mesin *realtime PCR* dengan pengaturan program: suhu sintesis cDNA 45°C selama 10 menit, denaturasi awal 95°C selama 2 menit, dan diikuti 40 siklus yang terdiri atas denaturasi 95°C selama 10 detik, *annealing* 54 °C selama 15 detik, dan *extension* 72°C selama 15 detik. Pembacaan sinyal fluorosens dilakukan di setiap siklus pada akhir tahap *extension*. Analisis kurva *melting* dilakukan dari suhu 55-95°C. Selain itu, gen beta-aktin sebagai kontrol diamplifikasi dengan perlakuan yang sama seperti amplifikasi gen GH. Primer untuk gen GH adalah ghAF1 (5' GCTTTCTCAAACAGCCTGAT 3') dan ghAR (5' GCATCGTTCCTAAGGTGTAC 3') dengan panjang produk 173 bp. Primer untuk gen beta-aktin adalah BA-F1 (5' TGACGGACAGGTCATCACC 3') dan BA-R1 (5' CTCATCGTACTCCTGCTTGC 3') dengan panjang produk 364 bp. Dengan sampel yang memiliki delta Ct ($Ct_{gh} - Ct_{actin}$) terendah sebagai kalibrator, tingkat ekspresi gen GH (R_{gh})



dan *A. australis* (Gambar 1). Fragmen GH-1 hanya teramplifikasi dari cDNA yang disintesis menggunakan sampel RNA dari hipofisa sebagai *template*. Selain dari sampel RNA hipofisa, fragmen GH-2 juga ditemukan pada sampel RNA otak dengan konsentrasi produk PCR yang jauh lebih sedikit. Namun hal ini kemungkinan terjadi karena adanya kontaminan DNA yang masih tersisa setelah tahapan *DNase treatment*. Hasil penelitian selama ini menunjukkan ekspresi gen hormon pertumbuhan hanya ditemukan pada hipofisa dan tidak ditemukan pada jaringan tubuh lain seperti otak (Dehkhoda *et al.*, 2018; Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Keberhasilan amplifikasi gen beta-aktin menunjukkan bahwa tidak ada masalah teknis dalam RT-PCR.



Gambar 1. Hasil RT-PCR gen hormon pertumbuhan (GH) dan beta-aktin dari sampel RNA hipofisa (h) dan otak (o) ikan sidat *Anguilla bicolor*. Lane M adalah marker 100 bp DNA. GH-1 diamplifikasi menggunakan sepasang *primer* (ghAF1-ghAR) dengan DNA target 486 bp dan GH-2 diamplifikasi menggunakan sepasang *primer* (ghAF2-ghAR) dengan DNA target 173 bp. Panjang produk amplifikasi untuk beta-aktin adalah 364 bp

Figure 1. RT-PCR results of growth hormone (GH) and beta-actin genes from the pituitary (h) and the brain (o) RNA samples of *Anguilla bicolor* eel. Lane M is a 100 bp DNA

marker. GH-1 was amplified using a pair of primers (ghAF1-ghAR) with a target DNA of 486 bp and GH-2 was amplified using a pair of primers (ghAF2-ghAR) with a target DNA of 173 bp. The amplification product length for beta-actin is 364 bp

Tabel 1. Similaritas sekuen nukleotida gen pengkode hormon pertumbuhan ikan sidat *Anguilla bicolor* dibandingkan gen yang sama dari jenis ikan sidat lain

Table 1. Similarity of the nucleotide sequence of the gene encoding growth hormone of the eel *Anguilla bicolor* compared to the same gene from other eel species

Spesies ikan sidat <i>Eel species</i>	Nomor akses <i>Accession number</i>	Similaritas (%) <i>Similarity (%)</i>
<i>Anguilla australis</i>	HQ436341.1	99,14
<i>Anguilla anguilla</i>	AY148493.1	99,14
<i>Anguilla japonica</i>	M24066.1	98,49

Hasil analisis BLAST menunjukkan sekuen tersebut memiliki similaritas sebesar 98,49-99,14% jika dibandingkan dengan sekuen gen GH *A. Anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica* (Tabel 1). Sekuen gen yang diperoleh juga dapat secara sempurna diterjemahkan ke dalam sekuen protein sepanjang 155 aa (Gambar 2). Hasil analisis BLAST dan hasil penerjemahan ini menunjukkan bahwa sekuen yang diperoleh terkonfirmasi sebagai sekuen gen GH *A bicolor*.

```

tgtcagcttctctgtgaaacgcgggtggagccatttcctctacaacctcttcaccagcgcc
V S F S V N A V E P I S L Y N L F T S A
gttaaccgagcacagcacctgcacacactggctgccgaaatatacaaggaatttgagcga
V N R A Q H L H T L A A E I Y K E F E R
agcatccacccgaggccacagacagctcagcaagacctccccattggccggctgttac
S I P P E A H R Q L S K T S P L A G C Y
tccgactccatccctacccccacaggcaaagatgaaacgcaggagaaatcggatgggtac
S D S I P T P T G K D E T Q E K S D G Y
ttgctgcgcatctcctcagccctgatccagtcatgggtgtatcctctgaagacctgagc
L L R I S S A L I Q S W V Y P L K T L S
gatgcttttctcaaacagcctgatgtttgggacctctgatgggatctttgataagctggag
D A F S N S L M F G T S D G I F D K L E
gacctgaacaaggcatcaatgaattaatgaagggttttaggtgacggtggcatttacatt
D L N K G I N E L M K V L G D G G I Y I
gaggatgtgagaaagctccggtacgagaacttcgacgtacaccttag
E D V R K L R Y E N F D V H L

```

Gambar 2. Sekuen nukleotida dan deduksi asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat, *Anguilla bicolor*

Figure 2. Nucleotide sequences and amino acid deduction of the growth hormone of *Anguilla bicolor*

Hasil analisis *multiple sequences alignment* menunjukkan ada tiga perbedaan residu asam amino GH dari empat spesies ikan sidat yang dibandingkan (Gambar 3). Pada perbedaan pertama, protein GH *A. bicolor* memiliki asam amino yang sama dengan protein GH *A. australis* dan *A. anguilla* yaitu asam amino lisin dan berbeda dibandingkan protein GH *A. japonica* (leusin). Perbedaan kedua menunjukkan protein GH *A. bicolor* memiliki asam amino leusin, sedangkan protein GH tiga spesies lainnya memiliki asam amino valin. Perbedaan ketiga menunjukkan protein GH *A. bicolor* dalam penelitian ini memiliki asam amino yang sama dengan protein GH *A. australis* dan *A. anguilla* (lisin), yang berbeda dibandingkan asam amino protein GH *A. japonica* (asparagin).

		▼1
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	MASGFLWFPVLLVSFSVNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLHTLAAEIIYKEFERSIPPEAHR	60
<i>Anguilla bicolor</i>	-----VSFSVNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLHTLAAEIIYKEFERSIPPEAHR	48
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	--SGFLLWFPVLLVSFSVNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLHTLAAEIIYKEFERSIPPEAHR	58
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	MASGFLWFPVLLVSFSVNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHLHTLAAEIIYKEFERSIPPEAHR	60

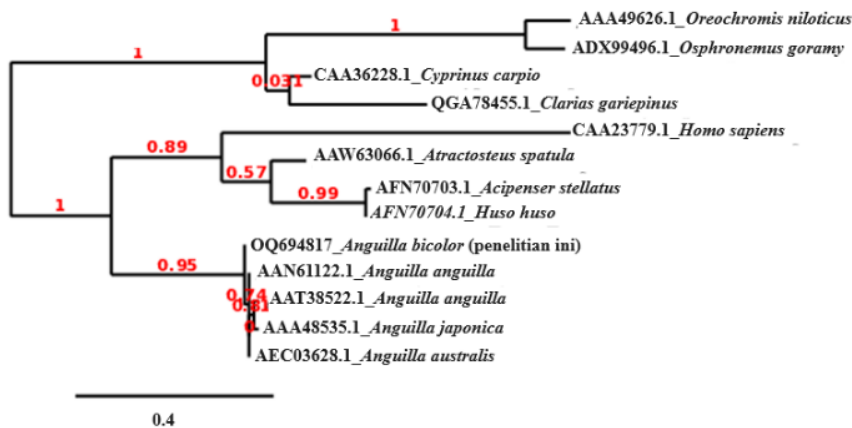
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	QLSKTSPLAGCYSDSIPTPTGKDETQEKSDGYLLRISSALIQSWVYPLKTLSDAFSNSLM	120
<i>Anguilla bicolor</i>	QLSKTSPLAGCYSDSIPTPTGKDETQEKSDGYLLRISSALIQSWVYPLKTLSDAFSNSLM	108
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	QLSKTSPLAGCYSDSIPTPTGKDETQEKSDGYLLRISSALIQSWVYPLKTLSDAFSNSLM	118
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	QLSKTSPLAGCYSDSIPTPTGKDETQEKSDGYLLRISSALIQSWVYPLKTLSDAFSNSLM	120

	▼2 ▼3	
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	FGTSDGIFDKLEDLNKGINELMKVVGDDGIYIEDVRNLRYENFDVHLRNDAGLMKNYGLL	180
<i>Anguilla bicolor</i>	FGTSDGIFDKLEDLNKGINELMKVVGDDGIYIEDVRKLRYENFDVHL-----	155
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	FGTSDGIFDKLEDLNKGINELMKVVGDDGIYIEDVRKLRYENFDVHLRNDASLMKNYGL-	177
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	FGTSDGIFDKLEDLNKGINELMKVVGDDGIYIEDVRKLRYENFDVHLRNDAGLMKNYGLL	180
	*****;*****;*****	
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	ACFKKDMHKVETYLKVTKCRRFVESNCTL	209
<i>Anguilla bicolor</i>	-----	155
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	-----	177
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	ACFKKDMHKVETYLKVTKCRRFVESNCTL	209

Gambar 3. *Multiple sequences alignment* sekuen asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat *Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor*, *Anguilla australis*, dan *Anguilla anguilla*. Tanda panah menunjukkan posisi asam amino yang berbeda

Figure 3. *Multiple sequences alignment* of amino acid sequences of growth hormone eels *Anguilla japonica*, *Anguilla bicolor*, *Anguilla australis*, and *Anguilla anguilla*. The arrows indicate the positions of the different amino acids

Gambar 4 menunjukkan hasil analisis filogenetik sekuen asam amino protein GH beberapa spesies ikan dan manusia. Berdasarkan sekuen asam amino GH, semua jenis ikan sidat termasuk *A. bicolor* membentuk satu percabangan yang berbeda dibandingkan jenis ikan lain. Percabangan kelompok ikan sidat lebih dekat dengan percabangan kelompok ikan seperti *Acipenser stellatus* dan *Atractosteus spatula* dan terpisah lebih jauh dengan percabangan kelompok ikan air tawar yang umum dibudidayakan di Indonesia, yaitu *Oreochromis niloticus*, *Osphronemus goramy*, *Cyprinus carpio*, dan *Clarias gariepinus*.



Gambar 4. Filogenetik sekuen asam amino hormon pertumbuhan beberapa jenis ikan sidat dan ikan lainnya
 Figure 4. Phylogenetic of growth hormone amino acid sequences of several species of eels and other fish

Analisis *multiple sequences alignment* dalam penelitian ini digunakan untuk membandingkan sekuen asam amino GH dari 13 spesies ikan, termasuk GH *A. bicolor* yang diperoleh dalam penelitian ini. Seperti halnya hasil analisis filogenetik, hasil analisis *multiple sequences alignment* juga menunjukkan bahwa GH memiliki variasi yang sangat tinggi berdasarkan urutan asam amino (Gambar 5). Dari sekuen asam amino yang secara sempurna

tersejajarkan, sekuen GH yang dibandingkan hanya memiliki 24 asam amino yang sama. Selain itu, Gambar 5 juga menunjukkan bahwa GH dari semua spesies yang diuji memiliki dua penanda dengan letak dan panjang yang konsisten antarspesies. Penanda pertama sepanjang 34 asam amino dan penanda kedua sepanjang 18 asam amino. Secara khusus berdasarkan sekuen parsial GH *A. bicolor* (155 aa) yang diperoleh dalam penelitian ini, penanda pertama GH *A. bicolor* terletak pada asam amino nomor 58-95.

CAA23779.1 <i>Homo sapiens</i>	MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRFLDNASRAHRLQALFDITYQEEA	60
<i>Anguilla bicolor</i>	-----VS--FS-----VXAVEPISLYNLFTSAVNRAQHNTLAAEIYKEPERS	41
AAT38522.1 <i>Anguilla anguilla</i>	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHNTLAAEIYKEPERS	53
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHNTLAAEIYKEPERS	53
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	--SGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHNTLAAEIYKEPERS	51
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	MASGFLLPVLLVS--FS-----VNAVEPISLYNLFTSAVNRAQHNTLAAEIYKEPERS	53
AAW63066.1 <i>Atractosteus spatula</i>	-----AQLHQLADIYKDEPRT	18
AFN70703.1 <i>Acipenser stellatus</i>	-----PKESGAYPMIPLSSLFTNAVLRAQYHQLADIYKDEPRT	40
AFN70704.1 <i>Huso huso</i>	-----CPVLLVI--LLVSPKESGAYPMIPLSSLFTNAVLRAQYHQLADIYKDEPRT	51
AAA49626.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	MNSVV-----LLSVVC-----LGVSSQQTIDSQRLFSIAVNRVTHQLAQRLFSDESS	51
ADX99496.1 <i>Osphronemus goramy</i>	MDKVV-----FLLSVLS-----VGVSQPIITDSQRLFSIAVSRVQHQLAQRLFSDESS	51
CAA36228.1 <i>Cyprinus carpio</i>	MARVL-----VLLSVVL-VS-LLVNGGRASDNQRLFNNAVIRVQHQLAKMINDYDEA	53
QGA78455.1 <i>Clarias gariepinus</i>	MARVL-----VLLSVVVGES-VFFYQGFATFETQRLFNNAVIRVQHQLAKMINDYDEA	54
	. ** ** *	;
CAA23779.1 <i>Homo sapiens</i>	YIPKEQKYSFLQNPQTSLEFESPTSNRETTQKNLELRILLIQHLEWQFLR	120
<i>Anguilla bicolor</i>	IPPEAHRQLSK-TSPLAGYDSPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	100
AAT38522.1 <i>Anguilla anguilla</i>	IPPEAHRQLSK-TSPLAGYDSPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	112
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	IPPEAHRQLSK-TSPLAGYDSPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	112
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	IPPEAHRQLSK-TSPLAGYDSPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	110
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	IPPEAHRQLSK-TSPLAGYDSPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	112
AAW63066.1 <i>Atractosteus spatula</i>	YVDEQRQSSK-SSPSAFYDETPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	77
AFN70703.1 <i>Acipenser stellatus</i>	YVDEQRHSSK-NSPSAFYDETPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	99
AFN70704.1 <i>Huso huso</i>	YVDEQRHSSK-NSPSAFYDETPTTGKDNTEKQDGYLRISAIQHWYELKTL	110
AAA49626.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	LQTEQRQLNK-IFLQDFNDYHISIDKHRTSRVVKLISINYGVENEFPSRLS	110
ADX99496.1 <i>Osphronemus goramy</i>	LQTEQRQLNK-IFLQDFNDYHISIDKHRTSRVVKLISINYGVENEFPSRLS	110
CAA36228.1 <i>Cyprinus carpio</i>	LLPEERRQLSK-IFPLSPNDYHISIDKHRTSRVVKLISINYGVENEFPSRLS	112
QGA78455.1 <i>Clarias gariepinus</i>	LLPEERRQLSK-IFPLSPNDYHISIDKHRTSRVVKLISINYGVENEFPSRLS	111
	. : * * * * : : * * * * : :	
CAA23779.1 <i>Homo sapiens</i>	SVFANSLVYGGASDSNVYDLKDEEETQTMGRLEDGSPRTGQ---IFKQYTSKFDNHS	177
<i>Anguilla bicolor</i>	DAFNSNLMFGTSD-GIFDKLEDNKGINEAMKVLGDGGIYIED---VRKLRYNFDVHL	155
AAT38522.1 <i>Anguilla anguilla</i>	DAFNSNLMFGTSD-GIFDKLEDNKGINEAMKVLGDGGIYIED---VRNLR-----	160
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	DAFNSNLMFGTSD-GIFDKLEDNKGINEAMKVLGDGGIYIED---VRNLRYNFDVHL	168
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	DAFNSNLMFGTSD-GIFDKLEDNKGINEAMKVLGDGGIYIED---VRKLRYNFDVHL	166
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	DAFNSNLMFGTSD-GIFDKLEDNKGINEAMKVLGDGGIYIED---VRKLRYNFDVHL	168
AAW63066.1 <i>Atractosteus spatula</i>	RVFNSNLFVGTSD-RIFEKQDEEETQTMGRLEDGSPRTGQ---FLTLYEKFDNLR	133
AFN70703.1 <i>Acipenser stellatus</i>	RVFTNSLVFTSD-RVFEKQDEEETQTMGRLEDGEGGFSST---LLKLTYDKFDNLR	154
AFN70704.1 <i>Huso huso</i>	RVFTNSLVFTSD-RVFEKQDEEETQTMGRLEDGEGGFSST---LLKLTYDKFDNLR	166
AAA49626.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	GGSS-----LRN-QISPRSEETKTEILLIRANQDEAENYPDTDTLQHPYGNYYQSLG	163
ADX99496.1 <i>Osphronemus goramy</i>	GGSS-----QRY-QISPRSEETKTEILLIRANQDEAEMFSDGVVPOLAPYGNYYQSLG	163
CAA36228.1 <i>Cyprinus carpio</i>	GTVSNSLTVGNPN-QLTEKADKMGESVLIQACLDGQPMDDNDS-LPLPFEDFYLTMG	170
QGA78455.1 <i>Clarias gariepinus</i>	-----LGNPY-HISEKAYKMGESVLIQACLDGQPMDDNDS-LPLPFEDFYLTMG	161
	: * * * * :	
CAA23779.1 <i>Homo sapiens</i>	NDDALLKNYGLLYTRKDMKVETFLRIVQRSV-EGSCGF---	217
<i>Anguilla bicolor</i>	-----	155
AAT38522.1 <i>Anguilla anguilla</i>	-----	160
AAA48535.1 <i>Anguilla japonica</i>	NDAGLMKNYGLLAIRKDMHKVETYLKVTKEIRFVESNCTL---	209
AEC03628.1 <i>Anguilla australis</i>	NDASLMKNYGL-----	177
AAN61122.1 <i>Anguilla anguilla</i>	NDAGLMKNYGLLAIRKDMHKVETYLKVTKEIRFVESNCTL---	209
AAW63066.1 <i>Atractosteus spatula</i>	NDDVLMKNYGLLAKK-----	150
AFN70703.1 <i>Acipenser stellatus</i>	-----	154
AFN70704.1 <i>Huso huso</i>	NDDALFKNYGLLSIRKDMHKVETYLK-----	193
AAA49626.1 <i>Oreochromis niloticus</i>	GNESLRQTYELLAIRKDMHKVETYLTVAKIRLSPEANCTL---	204
ADX99496.1 <i>Osphronemus goramy</i>	DESRLRRSYELLAIRKDMHKVETYLTVAKIRLSPEANCTL---	204
CAA36228.1 <i>Cyprinus carpio</i>	EN-NLRKSFRLLAIRKDMHKVETYLTVAKIRLSLDSNCTL---	210
QGA78455.1 <i>Clarias gariepinus</i>	EG-NLRKSFRLLSIRKDMHKVETYLTVAKIRLSLDSNCTLVEY	204

Gambar 5. Multiple sequences alignment sekuen asam amino hormon pertumbuhan ikan sidat, beberapa spesies ikan lain, dan manusia. Highlight hijau dan tanda * menunjukkan

jenis asam amino yang sama. Huruf merah menunjukkan somatotropin, *prolactin* and related hormones signature 1 (kelompok pertama) dan 2 (kelompok kedua).

Figure 5. Multiple sequences alignment of amino acid sequences of eel growth hormone, several other fish species, and humans. Green highlights and * mark indicate the same type of amino acid. Red letters indicate somatotropin, prolactin and related hormones signature 1 (first group) and 2 (second group).

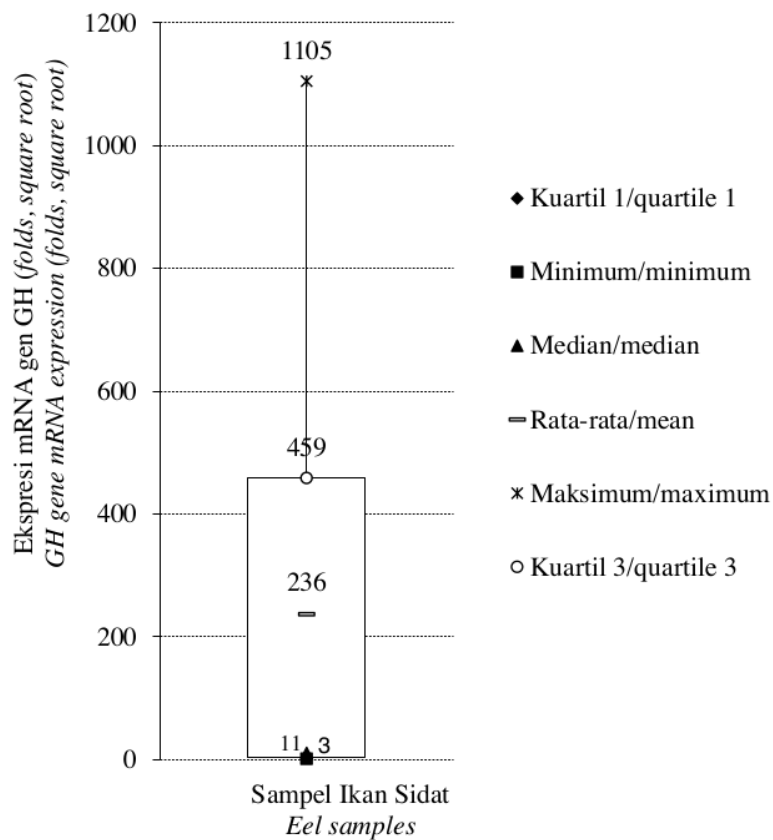
Fragmen gen GH ikan sidat *A. bicolor* yang berhasil teridentifikasi adalah bagian *coding region* sepanjang 465 bp yang mengkode 155 aa dan telah dideposit di GenBank dengan kode akses OQ694817. Sebagai pembandingan dan sekaligus dasar pembuatan *primer* adalah sekuen lengkap *coding region* gen GH *A. anguilla* dan *A. japonica*. *Coding region* gen GH pada kedua ikan sidat tersebut memiliki panjang 627 bp yang mengkode 209 aa (Degani *et al.*, 2003). Fragmen yang diperoleh dalam penelitian ini diyakini sebagai bagian gen GH dengan dasar: 1) memiliki similaritas yang sangat tinggi yaitu sekitar 98,49-99,14% dibandingkan sekuen gen GH ikan sidat lainnya, 2) secara filogenetik menjadi bagian dalam cabang gen GH ikan sidat, 3) secara tepat dapat diterjemahkan menjadi urutan asam amino tanpa adanya *gap*, dan 4) sekuen asam amino yang diperoleh meliputi *hormon signature* pertama dari protein GH.

Gen GH *A. bicolor* belum dapat terisolasi secara lengkap dalam penelitian ini karena keterbatasan metode yang digunakan. Identifikasi gen dalam penelitian ini dilakukan dengan metode RT-PCR konvensional menggunakan tiga *primer* dengan dua kombinasi pasang *primer* yang didesain berdasarkan *coding region* gen GH jenis ikan sidat lain. Isolasi gen secara utuh umumnya dilakukan dengan metode *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) berdasarkan sekuen parsial yang sudah diketahui (Yeku & Frohman, 2011). Sebagai contoh, metode ini banyak digunakan untuk memperoleh sekuen utuh gen GH ikan seperti dari *Pangasianodon hypophthalmus* (Sekar *et al.*, 2014), *Arapaima gigas* (Lima *et al.*, 2023), dan *Epinephelus akaara* (Yuan *et al.*, 2020).

Hasil analisis *multiple sequences alignment* menunjukkan bahwa protein GH dari berbagai hewan memiliki urutan asam amino yang sangat beragam. Namun demikian protein



Hasil analisis ekspresi gen dengan metode delta-delta CT menunjukkan tingkat ekspresi mRNA GH yang sangat bervariasi. Tingkat ekspresi mRNA GH pada ikan sidat yang tertinggi memiliki nilai 1.105 kali dibandingkan tingkat ekspresi yang paling rendah (Gambar 6). Variasi ekspresi mRNA GH sidat *A. bicolor* yang tinggi juga diperoleh pada penelitian sebelumnya (Nugrayani *et al.*, 2023).



Gambar 6. Ekspresi mRNA gen GH ikan sidat *Anguilla bicolor* yang dikelompokkan menjadi dua kelas ukuran berbeda. Hasil uji Mann Whitney menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antardua kelompok ukuran ($p > 0,05$)

Figure 6. mRNA expression of the GH gene of *Anguilla bicolor* eels grouped into two different size groups. Mann Whitney test result showed no significant difference between the two size groups ($p > 0.05$)

Keberhasilan isolasi gen GH dalam penelitian ini menjadi tahap penting dalam penelitian selanjutnya mengenai peran hormon ini pada ikan sidat *A. bicolor*. Hasil penelitian ini salah satunya dapat digunakan untuk merancang *real time* RT-PCR untuk kajian ekspresi gen hormon pertumbuhan pada ikan sidat *A. bicolor*. Dalam penelitian ini, salah satu kombinasi *primer* telah berhasil digunakan untuk mengukur ekspresi gen GH menggunakan teknik *real time* RT-PCR¹ dengan metode delta-delta Ct dengan gen beta-aktin sebagai acuan internal. Metode yang sama telah digunakan untuk mengevaluasi ekspresi gen GH *A. bicolor* yang diberikan mengandung kromium pikolinat (Nugrayani *et al.*, 2023). Metode delta-delta Ct termasuk metode analisis ekspresi gen secara semi kuantitatif. Hasil penggunaan metode ini tidak menunjukkan secara langsung jumlah molekul mRNA GH yang diproduksi dalam hipofisa ikan sidat. Hasil metode ini dapat menunjukkan angka kelipatan banyaknya mRNA suatu sampel relatif terhadap mRNA beta-aktin dan relatif terhadap sampel yang digunakan sebagai kalibrator (Forlenza *et al.*, 2012). Sampel yang digunakan sebagai kalibrator dalam penelitian ini adalah sampel yang memiliki nilai delta Ct ($Ct_{GH} - Ct_{Actin}$) yang paling rendah.

Hasil analisis ekspresi gen GH menggunakan metode delta-delta Ct menunjukkan variasi yang tinggi. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan peran GH terhadap pertumbuhan somatik (Blasco *et al.*, 2021; Ndandala *et al.*, 2022; Rotwein, 2020; Sudo *et al.*, 2022). Perbedaan ekspresi gen GH pada ikan sidat *A. anguilla* juga ditemukan pada jenis kelamin yang berbeda, di mana ikan sidat betina memiliki ekspresi gen GH yang lebih tinggi dibandingkan ikan sidat jantan. Hal tersebut juga berkaitan dengan pertumbuhan ikan sidat betina yang lebih cepat dibandingkan pertumbuhan ikan sidat jantan (Degani *et al.*, 2003). Tingkat ekspresi GH pada individu betina yang lebih tinggi dibandingkan pada individu jantan juga ditemukan pada ikan lain, yaitu *Scatophagus argus* (Deng *et al.*, 2014).

Selanjutnya metode delta-delta Ct dengan *primer* yang dirancang dalam penelitian ini dapat digunakan untuk mengkaji regulasi ekspresi GH pada ikan sidat *A. bicolor*. Regulasi

ekspresi GH menjadi kajian yang penting untuk dilakukan dalam rangka meningkatkan produktivitas akuakultur ikan sidat *A. bicolor*. Kajian ekspresi gen GH ikan sidat *A. anguilla* dapat diarahkan untuk mempelajari perannya dalam beberapa aspek seperti pertumbuhan, daya tahan tubuh, dan reproduksi. Tiga aspek tersebut merupakan bagian dari aspek penting dalam domestikasi ikan (Teletchea, 2021; Teletchea & Fontaine, 2014) dan secara umum diketahui berkaitan erat dengan gen GH (Jönsson & Bjönsson, 2002; Ndandala *et al.*, 2022). Ekspresi GH dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi, pemuasaan, dan kondisi lingkungan. Pemuasaan ikan dilaporkan meningkatkan ekspresi GH diiringi dengan penurunan IGF-I (Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Peningkatan kadar protein pada pakan meningkatkan ekspresi GH *Oncorhynchus mykiss* (Triantaphyllopoulos *et al.*, 2020). Tingkat ekspresi gen GH pada larva *A. anguilla* meningkat pada temperatur hangat (20-22°C) dan menurun pada temperatur dingin (16°C) (Politis *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Fragmen DNA sepanjang 486 bp berhasil diisolasi, disekuensing, dan teridentifikasi sebagai bagian dari gen hormon pertumbuhan. Sekuen gen hormon pertumbuhan *A. bicolor* memiliki similaritas tinggi jika dibandingkan dengan gen yang sama dari *A. anguilla*, *A. australis*, dan *A. japonica*. Ikan sidat dalam penelitian ini memiliki tingkat ekspresi gen hormon pertumbuhan yang sangat bervariasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Soedirman telah memfasilitasi pendanaan penelitian ini melalui skema Riset Institusi (SK Nomor : Kept. 3715/UN23.14/PN.01.00/2018). Terima kasih juga disampaikan atas fasilitas

laboratorium dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan Laboratorium Terpadu,
Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

14%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	jbdp.unbari.ac.id Internet	605 words — 12%
2	medpub.litbang.pertanian.go.id Internet	36 words — 1%
3	tessera.spandidos-publications.com Internet	33 words — 1%

EXCLUDE QUOTES ON
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON

EXCLUDE SOURCES < 1%
EXCLUDE MATCHES < 10 WORDS