

## Peningkatan laju pertumbuhan benih ikan gurame (*Osphronemus goramy* Lac.) yang direndam dalam air yang mengandung hormon pertumbuhan ikan mas

[Growth enhancement of *Osphronemus goramy* Lac. juvenile immersed in water containing recombinant *Cyprinus carpio* growth hormone]

Irmawati<sup>1,2,✉</sup>, Alimuddin<sup>3</sup>, Muhammad Zairin Jr.<sup>3</sup>,  
Muhammad Agus Suprayudi<sup>3</sup>, Aris Tri Wahyudi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

<sup>2</sup>Jurusan Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin

<sup>3</sup>Departemen Budi Daya Perairan, Institut Pertanian Bogor

<sup>4</sup>Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor

✉ Jurusan Perikanan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan UNHAS

Jln. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245

Surel: trif.ahwa@gmail.com

Diterima: 23 September 2011; Disetujui: 24 April 2012

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk memacu pertumbuhan benih ikan gurame melalui perendaman dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH). Hormon pertumbuhan rekombinan diekspresikan oleh plasmid *pCold-I/CcGH* di dalam *Escherichia coli* BL21(DE3). Badan inklusi diisolasi dari *E. coli* menggunakan lisozim dan metode sentrifugasi. Perendaman dilakukan selama 1 jam di dalam air yang mengandung 0,9% NaCl, 0,01% albumin serum sapi (BSA), dan badan inklusi rCcGH pada dosis 5 mg L<sup>-1</sup> (C1), 15 mg L<sup>-1</sup> (C3), dan 30 mg L<sup>-1</sup> (C6), sekali seminggu pada 4 minggu pertama. Ikan diberi kejutan salinitas 30 ppt NaCl selama dua menit sebelum ikan dipindahkan ke dalam air yang mengandung rCcGH. Sebagai kontrol ialah: benih ikan gurame tanpa perendaman (kontrol), benih ikan gurame yang diberi kejutan salinitas (SS), benih ikan gurame yang direndam di dalam air media yang mengandung BSA (BSA), dan benih ikan gurame yang direndam di dalam air yang mengandung BSA dan protein *pCold-I* tanpa rCcGH (*pCold*). Setelah tujuh minggu pemeliharaan, kelompok ikan yang direndam dalam air yang mengandung 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH, 72,90% bobot lebih berat dan 21,04% badan lebih panjang dibandingkan dengan kontrol serta 43,07% bobot lebih berat dan 14,64% badan lebih panjang dibandingkan dengan *pCold* ( $p > 0,05$ ). Kelangsungan hidup antar perlakuan dan kontrol tidak berbeda nyata. Biomassa kelompok ikan yang direndam dengan 30 mg L<sup>-1</sup> adalah yang tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. GH rekombinan ikan mas meningkatkan sintesis protein terlarut dan pemanfaatan lipid sebagai sumber energi sehingga mengoptimalkan pemanfaatan protein untuk pertumbuhan (*protein sparing effect*). Dengan demikian, perendaman dengan rCcGH dapat diaplikasikan untuk memacu pertumbuhan benih ikan gurame.

Kata penting: hormon pertumbuhan rekombinan, ikan gurame, perendaman, pertumbuhan.

### Abstract

This study was aimed to enhance the growth of the giant gourami juvenile by immersion with recombinant *Cyprinus carpio* growth hormone (rCcGH). Recombinant growth hormone was expressed by plasmid *pCold-I/CcGH* in *E. coli* BL21 (DE3). The inclusion bodies were isolated from *E. coli* using lyso-zyme and centrifugation method. Immersion with water containing 0.9% NaCl and 0.01% bovine serum albumin and inclusion bodies with different doses of rCcGH, 5 mg L<sup>-1</sup> (C1), 15 mg L<sup>-1</sup> (C3), and 30 mg L<sup>-1</sup> (C6) was performed for 1 hour on weekly basis for the first four weeks of experimental period. Fish were subjected to salinity shock of 30 ppt NaCl for 2 minutes before it was transferred into the water containing rCcGH. Controls fish were without immersion and salinity shock (control), immersed in 30 ppt NaCl for 2 minutes (SS), immersed in 0.01% BSA (BSA), and immersed in medium containing BSA and 30 mg L<sup>-1</sup> inclusion bodies of *pCold* without rCcGH (*pCold*). The giant gourami juvenile treated with 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH were 72.90% heavier and 21.04% longer ( $p < 0.05$ ) than the control, and 43.07% heavier and 14.64% longer ( $p < 0.05$ ) than the *pCold*. No significant difference in survival rate was obtained between treatments and controls. Biomass of fish treated 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH was the highest among others. The rCcGH was able to promote soluble protein synthesis and lipid utilization as energy sources to spare protein (*protein sparing effect*). Thus, immersion with rCcGH could be applied to enhance the growth of giant gourami juvenile.

Keywords: recombinant growth hormone, giant gourami, immersion, growth.

## Pendahuluan

Ikan gurame (*Osporonemus goramy* Lac.) merupakan salah satu spesies target revitalisasi perikanan untuk tujuan konsumsi dalam negeri yang produksinya ditargetkan meningkat sekitar 4% pertahun. Kendala dalam mewujudkan target tersebut adalah laju pertumbuhan somatik ikan gurame yang rendah, yang membutuhkan waktu sekitar tiga tahun untuk mencapai ukuran induk (2-3 kg per ekor untuk induk betina dan sekitar 4 kg per ekor untuk induk jantan).

Pertumbuhan adalah hasil dari interaksi molekuler yang kompleks, dimana hormon pertumbuhan (GH) memegang peran penting pada proses tersebut. Kajian tentang potensi penggunaan GH untuk diterapkan pada kegiatan budi daya ikan dengan mengkarakterisasi berbagai jenis GH ikan dan gen yang mengekspresikannya telah dilakukan sejak tahun 1970-an. Pada tahun 1980-an hingga tahun 1990-an, beberapa peneliti seperti Sekine *et al.* (1985) dan Cheng *et al.* (1995) telah menerapkan teknologi DNA rekombinan untuk memproduksi GH. Pada era tersebut, beberapa peneliti juga telah mengkaji tentang teknik pemberian protein GH rekombinan (rGH) serta efeknya pada pertumbuhan dan perkembangan ikan. Saat ini, beberapa cDNA GH ikan-ikan budi daya tropis juga telah diisolasi dan dikarakterisasi seperti ikan gurame (Nugroho *et al.*, 2008), ikan nila *Oreochromis niloticus* (Kobayashi *et al.*, 2007), ikan kerapu kertang *Epinephelus lanceolatus* (Mulyadi *et al.*, 2008) dan ikan kerapu tikus *Cromileptes altivelis* (Syaifudin *et al.*, 2008). Di antara cDNA tersebut, cDNA ikan gurame, ikan mas dan ikan kerapu kertang kemudian dibuat konstruksinya dengan menggunakan plasmid *pCold-I* (Alimuddin *et al.*, 2010).

Protein hormon pertumbuhan rekombinan ikan telah terbukti mampu memacu pertumbuhan beberapa spesies ikan (Moriyama & Kawauchi,

1990; Moriyama *et al.*, 1993; Ben-Atia *et al.*, 1999; Promdonkoy *et al.*, 2004, Alimuddin *et al.*, 2010; Utomo *et al.*, 2011; Putra, 2011), dan juga udang (Santiesteban *et al.*, 2010). Namun demikian, efek peningkatan pertumbuhan rGH, selain ditentukan oleh jenis rGH yang digunakan, juga ditentukan oleh jenis dan umur ikan target/uji (*species-specific* dan *age dependent*) (Hertz *et al.*, 1991) sehingga kajian tentang dosis rGH dan frekuensi pemberiannya untuk memacu laju pertumbuhan ikan gurame penting dilakukan. Selain itu, bagaimana mekanisme GH dalam memacu pertumbuhan ikan hingga saat ini belum sepenuhnya dimengerti.

Dosis rGH yang umum digunakan untuk memacu pertumbuhan ikan berkisar 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  100  $\text{mg L}^{-1}$  dengan frekuensi pemberian dua hingga empat kali. Sehubungan dengan hal tersebut penelitian ini diarahkan untuk menemukan dosis rGH ikan mas (rCcGH) terbaik yang dapat memacu laju pertumbuhan ikan gurame melalui perendaman serta menganalisis efek rCcGH pada aktivitas metabolisme ikan gurame, yang meliputi analisis kandungan protein terlarut, analisis biokimia, dan analisis aktivitas spesifik enzim lipase.

## Bahan dan metode

### *Vektor ekspresi dan produksi protein hormon pertumbuhan rekombinan*

Protein rCcGH yang digunakan diekspresikan pada vektor ekspresi *pCold* (Takara Bio Inc.). Plasmid tersebut dicirikan oleh sekuens *His-Tag*, *translation enhancing element* (TEE), dan faktor Xa *cleavage site promoter*, GenBank accession no. AB186388 dan mengandung promoter dari *cold-shock gene*, *cspA*, yang merupakan derivat dari *Escherichia coli*.

Produksi rCcGH mengikuti prosedur *cold shock expression system pCold DNA* (Takara, 2009). Satu koloni *E. coli* terpilih diinokulasi di

dalam 5 ml media 2xYT yang mengandung 1% ampisilin dan ditumbuhkan 16-18 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya sebanyak 1 ml disubkultur di dalam 60 ml media 2xYT yang mengandung 60 µg ml<sup>-1</sup> ampisilin pada suhu 37 °C. Setelah 2 jam, kultur *E. coli* diberi kejutan suhu pada 15 °C selama 30 menit. Ekspresi rCcGH diinduksi pada kondisi OD<sub>600</sub> dengan *Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) hingga konsentrasi akhir di dalam larutan menjadi 0,1-1,0 mM dan kultur dilanjutkan pada suhu 15 °C. Setelah 24 jam, sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm dengan suhu 4 °C selama 1 menit, dan disimpan pada suhu -80 °C hingga digunakan.

Isolasi badan inklusi dilakukan dengan melisis membran sel bakteri menggunakan lisozim. Pelet bakteri dilarutkan dalam 1.500 µL TE satu kali dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Pelet bakteri dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi pada kecepatan tinggi kemudian ditambahkan 5 mg lisozim yang dilarutkan dalam 1 ml TE satu kali kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan badan inklusi dibilas dua kali dengan 1 M NaCl yang mengandung 1% (w/v) Triton X-100 dan terakhir dibilas dengan PBS. Badan inklusi kemudian dilarutkan dalam PBS dan siap untuk digunakan atau disimpan pada suhu -80 °C.

Verifikasi protein berdasarkan bobot molekul dianalisis dengan SDS-PAGE (Walker, 2002) menggunakan *coomassie brilliant blue* sebagai pewarna (*CBB staining*). Posisi rCcGH diprediksi dengan *Prestained Protein Marker* (BioLabs<sub>inc.</sub>). Verifikasi dilanjutkan dengan *semi dryblotting* menggunakan *Nickel-NTA* (Ni-NTA) sebagai pelacak dan *alkaline phosphatase* (AP) sebagai pewarna serta *Magic Marker* (invitrogen) sebagai penanda. Kuantifikasi rGH dilakukan dengan metode *CBB staining* menggunakan *lumi-*

*nescent image analyzertipe* LAS-4000 mini (Fuji Film) dan BSA sebagai standar.

#### *Ikan uji dan desain percobaan*

Telur ikan gurame diperoleh dari pembenihan di Desa Cikupa, Kecamatan Tenjolaya, Kabupaten Bogor. Sebanyak 50 ekor benih ikan gurame berumur 7-10 hari setelah menetas ditimbang dan diberi kejutan salinitas dalam 200 ml 35 ppt NaCl selama dua menit, lalu direndam di dalam 200 ml air yang mengandung 5 mg L<sup>-1</sup> (C1), 15 mg L<sup>-1</sup> (C3), dan 30 mg L<sup>-1</sup> (C6) rCcGH, 0,9% NaCl dan 0,01% BSA selama 60 menit. Untuk menganalisis pengaruh kejutan salinitas, BSA, dan badan inklusi *pCold*, percobaan ini menyertakan empat jenis kontrol yaitu: benih ikan gurame tanpa perendaman (kontrol), benih ikan gurame yang diberi kejutan salinitas (SS), benih ikan gurame yang direndam di dalam air media yang mengandung BSA (BSA), dan benih ikan gurame yang direndam di dalam media yang mengandung BSA dan protein *pCold-I* tanpa rCcGH (*pCold*). Perendaman dilakukan setiap minggu selama empat minggu. Penentuan dosis terbaik berdasarkan dosis yang memberi efek laju pertambahan bobot dan panjang rata-rata terbesar serta kelangsungan hidup tertinggi.

Pemeliharaan dilakukan di dalam akuarium berukuran 30 cm x 20 cm x 20 cm dengan kepadatan 7 ekor L<sup>-1</sup> selama tiga minggu, kemudian dipindahkan ke akuarium berukuran 50 cm x 47 cm x 50 cm hingga minggu ke tujuh. Ikan diberi naupli *Artemia* sp. selama seminggu dan selanjutnya dengan cacing rambut secara *satiasi*. Pemeliharaan dilakukan di ruangan tertutup yang dilengkapi dengan sistem aerasi yang suhunya dipertahankan pada 29-31 °C dan oksigen terlarut sekitar 4 ppm. Air diganti setiap hari sebanyak 50-75 %.

*Analisis pertumbuhan dan kelangsungan hidup*

Efektivitas perendaman rCcGH terhadap pertumbuhan benih ikan gurame tercermin dari peningkatan bobot dan panjang benih ikan gurame. Biomassa ikan dan kelangsungan hidup diukur setiap minggu dan pada minggu ketujuh dilakukan pengukuran bobot dan panjang total badan individu.

**Protein terlarut.** Diakhir percobaan, sebanyak lima ekor ikan gurame dihomogenisasi dalam 300 µl ddH<sub>2</sub>O dingin dan disentrifugasi pada 12000×g selama 6 menit pada 4 °C (Brito *et al.*, 2000). Konsentrasi protein terlarut diukur dengan metode Bradford (Bradford, 1976).

**Uji proksimat.** Analisis biokimia dilakukan diakhir percobaan menggunakan metode AOAC (2000). Kandungan air diukur dengan menghitung selisih bobot ikan sebelum dan setelah dikeringkan menggunakan oven bersuhu 105-110 °C (Takeuchi, 1988). Kandungan protein (total nitrogen (N) x 6,25) ditentukan berdasarkan metode Kjeldhal dan isolasi kandungan lemak total berdasarkan metode Folch *et al.* (1957) dan Takeuchi (1988) menggunakan Soxhlet.

**Aktivitas enzim lipase.** Pada akhir percobaan, jeroan dari lima ekor ikan gurame dihomogenkan di dalam buffer borat pH 8 *on ice*. Homogenat disentrifugasi pada 10000×g selama 30 menit pada 4 °C. Konsentrasi protein terlarut dalam supernatan diukur dengan metode Bradford (Bradford, 1976) dan dibandingkan dengan standar BSA (Sigma).

Supernatan yang mengandung protein lipase direaksikan dengan *paranitrobutirat* (PNB) sebagai substrat selama 5 menit. Aktivitas enzim lipase diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas lipase dinyatakan sebagai U mg<sup>-1</sup> protein yang berarti satu unit lipase adalah jumlah enzim yang dibu-

tuhkan untuk menaikkan absorbansi sebesar 0,01 U pada 410 nm menit<sup>-1</sup> atau 1 µg *nitrofenil* yang dihasilkan dari reaksi PNB dengan ekstrak enzim menit<sup>-1</sup> (Borlongan, 1990).

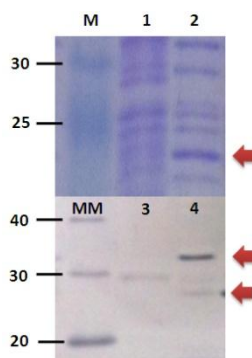
**Analisis statistik.** Perbedaan laju pertumbuhan bobot dan panjang, kelangsungan hidup, konsentrasi protein terlarut, persentase protein, lipid, karbohidrat, kadar air, dan aktivitas spesifik enzim lipase antara ikan yang mendapat perlakuan rCcGH dengan kontrol dianalisis dengan *one way ANOVA* menggunakan SPPS ver. 13.0 *for windows* pada tingkat probabilitas 0,05 (P=0,05).

**Hasil***Vektor ekspresi dan produksi protein hormon pertumbuhan rekombinan*

Analisis protein dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa rCcGH dapat diekspresikan, dan dibawah kondisi tereduksi dengan penambahan *β-mercaptoethanol*, pita protein diprediksi pada posisi 22 kDA (Gambar 1). Badan inklusi rCcGH yang berhasil diproduksi dari 60 ml kultur *E. coliBL21 (DE3)* adalah 24,83 mg atau sekitar 4,81% dari total protein badan inklusi (Gambar 2).

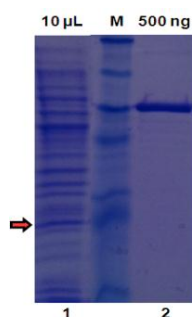
*Pertumbuhan benih ikan gurame yang direndam dengan rCcGH*

Hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas yang diberikan menggunakan teknik perendaman mampu memacu laju pertumbuhan benih ikan gurame. Peningkatan pertumbuhan benih ikan gurame mulai terlihat pada minggu ketiga, dan setelah tujuh minggu pemeliharaan, bobot ikan pada perlakuan C6 adalah 43,41%; 59,48%; 62,28%; dan 72,90% berturut-turut lebih besar dibanding *pCold*, BSA, SS, dan kontrol (Gambar 3).



Gambar 1. SDS-Page dan western blot *crude* protein hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) yang diekspresikan oleh bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Sekuen cDNA penyandi protein GH *mature* dari ikan mas dikloning ke dalam vektor ekspresi *pCold-I DNA* dan ditransformasi ke *E. coli*. Ekspresi rCcGH diinduksi dengan IPTG setelah di beri kejutan suhu pada 15°C. Isolasi rCcGH dilakukan secara kimiawi menggunakan lisozim dan diverifikasi dengan SDS-PAGE dan *western blot* menggunakan Ni-NTA. M: Marker, 1: SDS-PAGE rCcGH dalam bentuk terlarut, 2: SDS-PAGE badan inklusi rCcGH, MM: *Magic Marker*, 3: *semi dry blotting* rCcGH dalam bentuk terlarut, 4: *semi dry blotting* badan inklusi rCcGH. Tanda panah menunjukkan protein rCcGH.



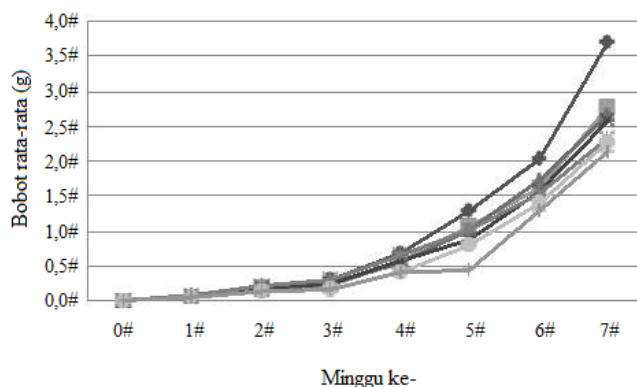
Gambar 2. Kuantifikasi badan inklusi protein rCcGH menggunakan *coomassie brilliant blue* (CBB) staining dengan serum albumin sapi (BSA) sebagai standar

Dengan menggunakan *luminescent image analyzer*, 10 µL badan inklusi setara dengan 20,69 ng 1: badan inklusi rCcGH; 2: standar BSA 500 ng. Tanda panah menunjukkan protein rCcGH.

Gambar 4 adalah *boxplot* sebaran bobot dan panjang rata-rata kelompok individu ikan gurame yang direndam dengan rCcGH dengan kelompok ikan yang tidak diberi rCcGH. *Boxplot* tersebut menginformasikan bahwa sekitar 50% juvenil ikan gurame yang direndam dengan 30 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH memiliki bobot tubuh 3,69 gram dan panjang 5,81 cm dan sekitar 25% memiliki bobot tubuh lebih besar atau sama dengan 4,35 gram dan panjang lebih besar atau sama dengan 6 cm. Bahkan *boxplot* tersebut menunjukkan bahwa terdapat satu individu yang berbobot 6,70 gram dan tiga individu yang memiliki panjang sekitar 6,75-7,00 cm. Sekitar 50% ikan yang di-

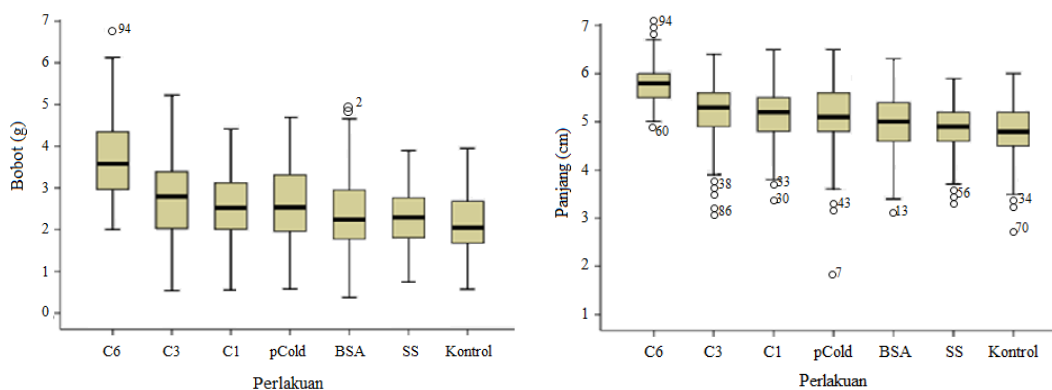
rendam dengan 15 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH dan 5 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH masing-masing berbobot 2,77 gram dengan panjang sekitar 5,22 cm dan 2,68 gram dengan panjang sekitar 5,14 cm. Sementara keempat kelompok kontrol (*pCold*, BSA, SS, dan kontrol) rata-rata berbobot 2,14-2,58 gram dengan panjang berkisar 4,80-5,07 cm. Kelangsungan hidup antara ikan yang direndam rCcGH dengan keempat kontrol tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Bobot dan panjang rata-rata individu serta biomassa pada perlakuan C6 adalah yang tertinggi dan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan perlakuan C3 dan C1 serta keempat kontrol lainnya (*pCold*, BSA, SS, kontrol) (Tabel 1).

laju pertumbuhan benih ikan gurame



Gambar 3. Pola pertumbuhan bobot ikan gurame yang direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) dibandingkan dengan kontrol

Keterangan: ◆= C6# kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 30 mg.L<sup>-1</sup>rCcGH; ■= C3# kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 15 mg.L<sup>-1</sup>rCcGH; ▲= C1# kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 5 mg.L<sup>-1</sup>rCcGH; ✕= pCold# kejutan salinitas 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 0 mg.L<sup>-1</sup>rCcGH; \* = BSA# kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA; ●= S5# kejutan salinitas (30 ppt NaCl, 2 menit; + = Kontrol# tanpa perlakuan



Gambar 4. Pola sebaran bobot dan panjang badan ikan gurame yang direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) dibandingkan dengan kontrol

Kotak (box) dengan garis tengahnya (median) meng-gambarkan kesimetrikan data bobot dan panjang badan ikan. Garis terbawah kotak menggambarkan kondisi 25% bobot dan panjang ikan, garis teratas menggambarkan 75% kondisi bobot dan panjang ikan. (C6: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C3: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 15 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C1: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 5 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; pCold: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 0 mg L<sup>-1</sup>rCcGH; BSA: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA; SS: kejutan salinitas (30 ppt NaCl, 2 menit); Kontrol: tanpa perlakuan).

Tabel 1. Kelangsungan hidup, rata-rata bobot dan panjang individu serta biomassa ikan gurame yang direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) dengan kontrol (pCold, BSA, SS, kontrol)

Perlakuan	Kelangsungan hidup	Rata-rata bobot individu (gram)	Rata-rata panjang individu (cm)	Biomassa (gram)
C6	96,67 ± 3,06 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,93 <sup>a</sup>	5,81 ± 0,12 <sup>a</sup>	181,46 ± 24,91 <sup>a</sup>
C3	98,00 ± 3,46 <sup>a</sup>	2,74 ± 0,93 <sup>b</sup>	5,21 ± 0,15 <sup>b</sup>	135,38 ± 13,26 <sup>b</sup>
C1	94,67 ± 3,06 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,92 <sup>b</sup>	5,14 ± 0,12 <sup>bc</sup>	127,08 ± 52,68 <sup>bc</sup>
pCold	91,33 ± 5,03 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,89 <sup>b</sup>	5,07 ± 0,11 <sup>bcd</sup>	118,15 ± 11,49 <sup>bc</sup>
BSA	96,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,92 <sup>c</sup>	4,92 ± 0,22 <sup>bcd</sup>	111,37 ± 13,61 <sup>bc</sup>
SS	98,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,69 <sup>c</sup>	4,89 ± 0,13 <sup>cd</sup>	111,98 ± 9,59 <sup>bc</sup>
Kontrol	94,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,68 <sup>c</sup>	4,80 ± 0,07 <sup>d</sup>	100,93 ± 5,35 <sup>c</sup>

Huruf yang berbeda mengindikasikan perbedaan efek perlakuan berdasarkan uji lanjut Duncan (P < 0,05). (C6: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C3:kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 15 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C1: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 5 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; pCold: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 0 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; BSA: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA; SS: kejutan salinitas (30 ppt NaCl, 2 menit); Kontrol = tanpa perlakuan).

Tabel 2. Kandungan protein terlarut dan hasil analisis kimiawi (proksimat) ikan gurame setelah tujuh minggu pemeliharaan

Perlakuan	Parameter Biokimia (%)				
	Protein terlarut	Protein tubuh	Lemak tubuh	Karbohidrat	Kadar air
C6	14,21 ± 0,12 <sup>a</sup>	11,61 ± 0,61 <sup>a</sup>	5,34 ± 0,23 <sup>a</sup>	4,09 ± 1,03 <sup>a</sup>	76,46 ± 0,06 <sup>a</sup>
C3	12,00 ± 0,46 <sup>b</sup>	12,74 ± 0,34 <sup>a</sup>	6,58 ± 0,24 <sup>ab</sup>	3,80 ± 0,13 <sup>ab</sup>	74,61 ± 0,01 <sup>b</sup>
C1	9,63 ± 0,74 <sup>c</sup>	13,01 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,59 ± 0,55 <sup>ab</sup>	2,86 ± 0,24 <sup>ab</sup>	75,08 ± 0,04 <sup>c</sup>
<i>pCold</i>	9,84 ± 0,09 <sup>c</sup>	12,91 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,58 ± 1,25 <sup>c</sup>	0,24 ± 0,23 <sup>d</sup>	73,60 ± 0,13 <sup>d</sup>
BSA	9,35 ± 0,57 <sup>c</sup>	12,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,84 ± 1,63 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>d</sup>	74,94 ± 0,05 <sup>c</sup>
SS	6,97 ± 0,52 <sup>d</sup>	13,08 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,64 <sup>ab</sup>	2,56 ± 0,09 <sup>c</sup>	74,30 ± 0,02 <sup>e</sup>
Kontrol	9,24 ± 0,13 <sup>c</sup>	13,66 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,86 ± 0,71 <sup>ab</sup>	1,92 ± 0,19 <sup>c</sup>	75,69 ± 0,01 <sup>f</sup>

Huruf yang berbeda mengindikasikan perbedaan efek perlakuan berdasarkan uji lanjut Duncan ( $P < 0,05$ ). (C6: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C3: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 15 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; C1: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 5 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; *pCold*: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA + 0 mg L<sup>-1</sup> rCcGH; BSA: kejutan salinitas + 0,9% NaCl + 0,01% BSA; SS: kejutan salinitas (30 pptNaCl, 2 menit); Kontrol = tanpa perlakuan).

#### Efek GH terhadap proses metabolisme

Kandungan protein terlarut dan hasil analisis proksimat disajikan pada Tabel 2. Kandungan protein terlarut tertinggi terukur pada kelompok ikan gurame C6 yang direndam dengan 30 mg L<sup>-1</sup> rCcGH. Penurunan dosis rCcGH 30 mg L<sup>-1</sup> pada kelompok ikan C6 menjadi 15 mg L<sup>-1</sup> dan 5 mg L<sup>-1</sup> berturut-turut pada kelompok ikan C3 dan C1 menurunkan persentase protein terlarut secara nyata ( $P < 0,05$ ). Dosis 30 mg L<sup>-1</sup> dan 15 mg L<sup>-1</sup> rCcGH yang diberikan pada benih ikan gurame menggunakan metode perendaman signifikan meningkatkan kandungan protein terlarut ( $P < 0,05$ ) sedangkan pada dosis 5 mg L<sup>-1</sup>, rCcGH tidak memberi efek yang signifikan lagi terhadap peningkatan kandungan protein terlarut pada ikan gurame ( $P > 0,05$ ).

Perendaman dengan rCcGH tidak mengubah kandungan protein tubuh ikan gurame ( $P \geq 0,05$ ) tetapi memengaruhi kadar lemak tubuh ikan gurame. Benih ikan gurame yang direndam dengan rCcGH menunjukkan pola kandungan lemak tubuh yang hampir sama dan tidak berbeda nyata dengan SS serta kontrol ( $P \geq 0,05$ ) namun berbeda ( $P < 0,05$ ) dengan ikan yang direndam dengan *pCold* serta ikanyang direndam dengan BSA. Kadar lemak tubuh terendah terdapat pada kelompok ikan C6, dan hal ini menunjukkan bah-

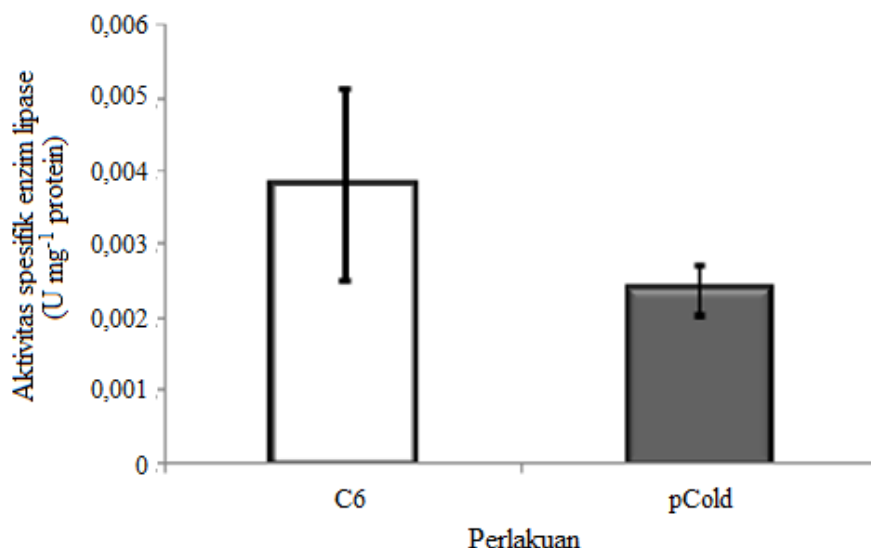
wa terjadi perombakan lemak pada sel-sel jaringan adipose.

Persentase karbohidrat pada kelompok ikan kontrol (*pCold*, BSA, SS, kontrol) signifikan lebih rendah dibanding dengan perlakuan (C6, C3, C1) ( $P < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian rCcGH terhadap metabolisme karbohidrat.

Analisis aktivitas spesifik enzim lipase hanya dilakukan pada kelompok ikan yang memberikan respons terbaik terhadap pertumbuhan dibandingkan dengan *pCold* sebagai kontrol. Aktivitas spesifik enzim lipase ikan yang direndam dengan rCcGH signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang hanya direndam dengan *pCold* ( $P < 0,05$ ) (Gambar 5).

#### Pembahasan

Analisis dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat pita protein pada posisi sekitar 22 kDa yang diduga sebagai rCcGH. Selanjutnya Ni-NTA mampu mengikat *His-tagged* rCcGH yang mengindikasikan bahwa bakteri *E. coli* yang disisipi dengan vektor ekspresi *pCold-I/CcGH* memproduksi rCcGH. Protein yang diproduksi dengan sistem rekombinan di *E. coli* terakumulasi dalam bentuk agregat yang dikenal sebagai badan inklusi yang merupakan polipepti-



Gambar 5. Aktivitas spesifik enzim lipase ikan gurame yang direndam dengan hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) dan kontrol *pCold*  
 C6:kejutan salinitas + 0,01% BSA + 30 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH; *pCold*:kejutan salinitas + 0,01% BSA + 0 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH.

da fungsional. Produksi rCcGH dalam bentuk badan inklusi adalah 24,83 mg atau sekitar 4,81% dari total protein badan inklusi *E. coli* BL21 (DE3).

GH berperan sentral dalam meregulasi pertumbuhan dan perkembangan pada kelompok vertebrata, secara langsung maupun secara tidak langsung. Secara langsung melalui reseptornya (GHRs) pada jaringan target dan otot, dan secara tidak langsung melalui *insulin-like growth factor* (IGFs) dan regulasi proses metabolisme (Pedroso *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2011). Perbedaan respons pertumbuhan antara ikan perlakuan dan ikan kontrol akibat perendaman dengan rCcGH mulai terlihat sejak minggu ketiga hingga minggu ketujuh pengamatan, yang mengindikasikan bahwa rCcGH aktif secara biologi pada benih ikan gurame. Dosis 30 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH mampu memacu laju pertumbuhan bobot badan benih ikan gurame sebesar 72,90% lebih berat dibandingkan dengan kontrol dan 21,04% badan lebih panjang dibandingkan dengan kontrol serta 43,07% bobot lebih berat dan 14,64% badan lebih panjang dibandingkan dengan *pCold*. Hasil

tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan hasil pada benih ikan *coho salmon* dan *chum salmon* yang masing-masing meningkat pertumbuhannya sebesar 43% dan 60% (Moriyama & Kawauchi, 1990) setelah direndam dengan rGH ikan salmon pada dosis dan waktu yang sama, tetapi lebih rendah dibandingkan dengan larva ikan nila merah yang direndam dengan rGH tilapia yang meningkat pertumbuhannya hingga 171% setelah 6 minggu pemeliharaan (Acosta *et al.*, 2007). Dengan menggunakan rCcGH, pertumbuhan ikan mas mampu dipacu hingga 106,56% lebih besar dibanding kontrol *pCold* pada minggu kedelapan (Utomo, 2011), namun rCcGH yang diberikan menggunakan metode penyuntikan. Uji statistik (Tabel 1) menunjukkan bahwa kejutan salinitas selama dua menit dan penambahan BSA sebesar 0,01% ke media perendaman tidak signifikan memacu pertumbuhan benih ikan gurame.

Beberapa usaha yang dapat dilakukan untuk memacu pertumbuhan ikan selain aplikasi protein rekombinan adalah persilangan atau hibridisasi, pemanfaatan sifat unggul ikan jantan, seleksi, serta gen transfer atau teknologi transgene-



sis. Untuk memperoleh populasi ikan gurame dengan laju pertumbuhan yang tinggi, keempat metode di atas kurang aplikatif diterapkan karena membutuhkan waktu yang cukup lama disebabkan proses regenerasi ikan gurame sekitar tiga tahun untuk mencapai ukuran induk. Pada kegiatan seleksi misalnya, peningkatan pertumbuhan bobot sebesar 10% per generasi, yang berarti untuk mencapai peningkatan pertumbuhan bobot sebesar 72,90% pada ikan gurame membutuhkan tujuh generasi atau sekitar 21 tahun.

Metode transfer gen mampu memacu laju pertumbuhan sebesar 100-3000% pada generasi ketiga (Alimuddin, 2010). Namun demikian, karena waktu yang dibutuhkan untuk mencapai generasi ketiga adalah sekitar enam tahun, maka metode ini juga dianggap kurang aplikatif diterapkan pada peningkatan produktivitas kegiatan budi daya ikan gurame.

Kandungan protein terlarut pada kelompok ikan C6 signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan perlakuan perendaman lainnya serta kontrol. Hasil penelitian Santiesteban *et al.* (2010) juga menunjukkan kandungan protein terlarut yang tinggi pada postlarva *Litopenaeus vannamei* yang direndam dengan rekombinan GH tilapia (*rTiGH*). Demikian juga Brito *et al.* (2000) menunjukkan bahwa kandungan protein terlarut yang tinggi berasosiasi dengan udang yang menunjukkan laju pertumbuhan yang tinggi. Konsentrasi protein terlarut yang tinggi pada kelompok ikan C6 membuktikan bahwa GH bersifat anabolik, yaitu meningkatkan sintesis protein. Aksi anabolik *rCcGH* juga tercermin pada pertambahan bobot yang signifikan lebih besar pada kelompok ikan C6 dibandingkan dengan perlakuan dosis lainnya dan kontrol. Mekanismenya diduga melalui optimasi pemanfaatan protein tubuh untuk proses sintesis protein struktural yang diperlukan untuk mempertahankan pertum-

bahan yang dipercepat. Lebih lanjut dijelaskan bahwa GH akan memacu pertumbuhan dengan aksi anaboliknya menggunakan jalur metabolisme protein apabila energi cukup tersedia.

Peningkatan aktivitas spesifik enzim lipase pada perendaman dosis 30 mg ml<sup>-1</sup> *rCcGH* yang didukung oleh tingginya kandungan protein terlarut menunjukkan peran *rCcGH* dalam memobilisasi lipid (efek lipolitik). Menurut Björnsson (1997), mobilisasi lipid tercermin dari meningkatnya aktivitas enzim lipase di hati. Apabila lemak diperlukan untuk fungsi sel, maka enzim lipoprotein lipase (LPS) yang terikat pada kapiler dan membran sel akan memacu proses lipolisis untuk melepaskan lemak dari kapiler protein dan menghidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam-asam lemak bebas (*free fatty acids*). Llorente *et al.* (2004) juga telah membuktikan melalui percobaannya pada ikan *rainbow trout* bahwa salah satu efek tidak langsung GH adalah pemecahan lipid (*lipid breakdown*) dan pelepasan asam lemak. Peningkatan aktivitas lipolitik yang dikatalisis oleh enzim lipase akan meningkatkan pemanfaatan lipid untuk menghasilkan energi dan mempertahankan pertumbuhan yang dipercepat (Gravholt *et al.*, 1999).

Persentase karbohidrat mencerminkan kondisi glukosa, selulosa, hemiselulosa, pati, dan lignin. Studi yang mengkaji efek GH pada metabolisme karbohidrat di ikan masih jarang dilakukan. Pada percobaan ini, persentase karbohidrat yang signifikan lebih rendah pada ikan kontrol menunjukkan bahwa ikan gurame secara umum memanfaatkan karbohidrat sebagai sumber energi utama, dan pemberian *rCcGH* mengalihkan karbohidrat ke lemak sebagai sumber energi utama sehingga meningkatkan kadar glukosa darah (efek anti-insulin). Beberapa penelitian juga melaporkan hasil serupa; Sweeting *et al.* (1985); Leung *et al.* (1991); Llorente *et al.* (2004) me-

nunjukkan bahwa rGH memiliki efek hiperglisemia yang disebabkan karena menurunnya penyerapan glukosa oleh sel-sel adipose, Leung *et al.* (1991) juga menyatakan bahwa pemberian rGH mereduksi sintesis glikogen dan menurunkan level glikogen hati tilapia. Namun demikian pada penelitian ini, dosis 30 mg ml<sup>-1</sup> rCcGH (C6) diduga masih mendukung pemanfaatan glukosa menjadi triasilgliserol, tercermin dari kandungan lipid yang tidak berbeda nyata dengan kelompok ikan C3, C1, SS, dan kontrol.

### Simpulan

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian hormon pertumbuhan rekombinan ikan mas (rCcGH) pada dosis 30 mg ml<sup>-1</sup> mampu memacu laju pertumbuhan benih ikan gurame hingga minggu ke-7 pemeliharaan dan pemberian rCcGH melalui perendaman tidak memberi efek negatif pada kelangsungan hidup. rCcGH meningkatkan pemanfaatan lipid sebagai sumber energi sehingga mengoptimalkan pemanfaatan protein untuk pertumbuhan (*protein sparing effect*).

### Persantunan

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Republik Indonesia melalui beasiswa BPPS Dikti. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Associate Prof. Dr. Goro Yoshizaki dari Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan Uji SDS-PAGE dan *semi dry blotting* dan Dr. Irfan Faisal dari BPPT Serpong atas pemberian *E. coli* BL21 (DE3).

### Daftar pustaka

Acosta JR, Morales R, Morales M, Alonso M, Estrada MP. 2007. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone

accelerates the growth of tilapia. *Biotechnology Letter*, 29:1671-1676.

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

AOAC. 2000. In: Helrich K. (Ed.). *Official methods of analysis*, 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Ben-Atia I, Fine M, Tandler A, Funkenstein B, Maurice S, Cavari B, Gertler A. 1999. Preparation of recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. *Gene Comparative Endocrinology*, 113:155-164.

Björnsson BT. 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17:9-24.

Borlongan IG. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 89:315-325.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Brito R, Chimal EM, Gaxiola G, Rosas C. 2000. Growth, metabolic rate, and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 255:21-36.

Cheng CM. 1995. A Study on a recombinant teleostean growth hormone [Dissertation] Maryland: University of Maryland, Baltimore County.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509.

Gravholt CH, Schmitz O, Simonsen L, Bulow J, Christiansen JS, Moller N. 1999. Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 277:E848-E854.

Hertz Y, Tchelet A, Madar Z, Gertler A. 1991. Absorption of bioactive human growth hormone after oral administration in the com-

- mon carp and its enhancement by deoxycholate. *Journal Comparative of Physiology*, 161:159-163.
- Kobayashi S, Alimuddin, Morita T, Miwa M, Lu J, Endo M, Takeuchi T, Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture*, 270:427-435.
- Leung TC, Woo NYS. 1991. Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99:633-636.
- Llorente MDH, Gomez MJD, Ruiz JC, Lopez PM, Navarro SZ. 2004. Effect of recombinant human GH and GHRH on plasma metabolite levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Physiology and Biochemistry*, 60(3):211-216.
- Moriyama S & Kawauchi H. 1990. Growth stimulation of juvenile salmonids by immersion in recombinant salmon growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(1):31-34.
- Moriyama S, Yamamoto H, Sugimoto S, Abe T, Hirano T, Kawauchi H. 1993. Oral administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 112:99-106.
- Mulyadi D, Alimuddin, Subyako, Rustidja, Maftuch. 2008. Kloning gen hormon pertumbuhan (GH) ikan kerapu kertang (*Epinephelus lanceolatus*). Disampaikan dalam "Simposium Nasional Bioteknologi Akuakultur II", 14 Agustus 2008. IPB International Convention Center, Botani Square, Bogor. 28 hlm.
- Nugroho E, Alimuddin, Kristanto AH, Carman O, Megawati N. 2008. Kloning cDNA hormon pertumbuhan dari ikan gurame (*Osteophoronemus gouramy*). *Jurnal Riset Akuakultur*, 3(2):183-190.
- Pedroso FI, Fukada H, Masumoto T. 2009. In vivo and in vitro effect of recombinant salmon growth hormone treatment on IGF-1 and IGFBPs in yellow tail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 75:887-894.
- Pierce AL, Breves JP, Moriyama S, Hirano T, Grau EG. 2011. Differential regulation of IGF1 and IGF2 mRNA level in tilapia hepatocytes: effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. *Journal of Endocrinology*, 211: 201-210.
- Promdonkoy B, Warit S, Panyim S. 2004. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (*Pangasianodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 26:649-653.
- Putra HGP. 2011. Pertumbuhan dan kelangsungan hidup benih ikan gurame yang diberi protein rekombinan GH melalui perendaman dengan dosis berbeda. [Skripsi]. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Santiesteban D, Martin 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.
- Sekine S, Mizukami T, Nishi T. 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *PNAS*, 82: 4306-4310.
- Sweeting RM, Wagner GF, McKeown BA. 1985. Changes in plasma glucose, amino acid nitrogen and growth hormone during smoltification and seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 45:185-197.
- Syaifudin M, Alimuddin, Widyastuti U, Sudrajat AO, Sumantadinata K, Aliah RS. 2007. cDNA encoding growth hormone from humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Biotropia*, 14:1-6.
- [TAKARA] Takara Bio Inc. 2009. Cold shock expression system: *pCold I* DNA. Takara Bio Inc., Jepang.
- Takeuchi T. 1988. Laboratory work-chemical evaluation of dietary nutrients. In: Watanabe T (editor). *Fish Nutrition and Mariculture*. Tokyo: JICA Textbook the General Aquaculture Course. pp. 179-233.
- Utomo DSC, Alimuddin, Sudrajat AO, Faizal I. 2011. Produksi dan uji bioaktivitas protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan mas. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 10(1): 44-50.
- Walker JM. 2002. *The protein protocols handbook*. Second Edition. Human Press Inc., Totowa New Jersey.