

Produksi dan uji bioaktivitas protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan mas

Production and bioactivity test of recombinant protein common carp growth hormone

Deny Sapto Chondro Utomo¹, Alimuddin², Agus Oman Sudrajat², Irvan Faizal³

¹ Program Magister Ilmu Akuakultur, FPIK, Institut Pertanian Bogor

² Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor

³ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.

ABSTRACT

This study aimed to produce recombinant growth hormone (rGH) protein of common carp (*Cyprinus carpio*) and evaluate its bioactivity. DNA fragment encoding mature GH protein of common carp (*mCcGH*) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method and PCR products were then ligated into pCold I to generate pCold I-*mCcGH* protein expression vector. *Escherichia coli* BL21 (DE3) harboring pCold I-*mCcGH* was cultured in the 2xYT medium at 15 °C for 24 hours and protein production was induced by isopropyl-beta-thio galactopyranoside (IPTG). The inclusion bodies containing rGH protein from *E. coli* transformants were isolated by sonication method and analyzed by SDS-PAGE. The result showed that rGH with molecular weight of about 25 kDa was obtained. Common carp juveniles with average body weight of 5.2±0.4 g were intramuscularly injected once a week for 4 weeks with rGH protein solution from 1 µg bacterial cells per gram fish body weight. The result showed that juveniles fish injected with rGH grew 106.56% higher than control. This result indicated that rGH produced in *E. coli* BL21 possessed biological activity and it may be useful to improve growth of aquaculture species.

Key words: growth hormone, recombinant protein, common carp

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan menghasilkan protein rekombinan hormon pertumbuhan (*growth hormone*, GH) dari ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan menguji bioaktivitasnya. Fragmen DNA penyandi protein matang (*mature*) GH ikan mas (*mCcGH*) diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR dan hasilnya kemudian diligasi ke dalam pCold-I untuk menghasilkan konstruksi vektor ekspresi pCold-I-*mCcGH*. Plasmid pCold-I-*mCcGH* ditransformasi ke bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3), dikultur dalam media 2xYT cair pada suhu 15°C selama 24 jam dan produksi protein diinduksi dengan menggunakan isopropyl-beta-thio galactopyranoside (IPTG). Badan inklusi yang mengandung protein rekombinan GH (rGH) dari bakteri *E. coli* transforman diisolasi menggunakan metode sonikasi dan dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rGH dengan bobot molekul sekitar 25 kDa berhasil diproduksi. Benih ikan mas dengan bobot rata-rata 5,15±0,4 g diinjeksi secara intramuskular satu kali per minggu selama 4 minggu dengan larutan rGH hasil ekstraksi dari 1 µg pelet bakteri/g bobot ikan. Benih yang disuntik dengan rGH tumbuh sekitar 100% lebih cepat bila dibandingkan dengan kontrol yang tidak diinjeksi rGH. Hasil ini mengindikasikan bahwa rGH yang diproduksi dalam bakteri *E. coli* memiliki bioaktivitas dan dapat bermanfaat untuk memacu pertumbuhan spesies ikan-ikan budidaya.

Kata kunci: hormon pertumbuhan, protein rekombinan, ikan mas

PENDAHULUAN

Biologi molekuler dalam bidang perikanan telah berkembang dengan pesat. Beberapa perkembangan yang ada antara lain teknologi transgenik dan protein/DNA rekombinan. Teknologi tersebut berguna untuk menunjang kemajuan perikanan.

Teknologi transgenik bermanfaat untuk menyisipkan gen-gen yang berguna dan menghasilkan ikan budidaya dengan karakter unggul. Contoh penggunaan teknologi transgenik adalah penyisipan gen penyandi hormon pertumbuhan (*growth hormone* (GH)) yang dapat memacu pertumbuhan ikan menjadi beberapa kali lipat dari ikan normal

(Lutz, 2001), *anti freeze protein* (AFP) yang dapat meningkatkan toleransi ikan pada suhu dingin (Beardmore dan Porter, 2003) dan pigmen warna yang dapat menghasilkan ikan hias yang lebih menarik dengan beraneka ragam warna. Sementara itu, teknologi rekombinan dimanfaatkan untuk menghasilkan DNA ataupun protein secara massal yang bermanfaat bagi dengan menggunakan bakteri, ragi, maupun sel sebagai media perbanyakannya (Sekine *et al.*, 1985; Mahmoud 1999; Anathy *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003).

GH memacu pertumbuhan ikan dengan merangsang selera makan ikan dan memperbaiki konversi pakan (Donaldson *et al.*, 1979). Perubahan pada kedua parameter tersebut yang terjadi setelah perlakuan pemberian GH menunjukkan cara kerja GH pada metabolisme. Akan tetapi, ketersediaan GH sangat sedikit dan terbatas. Untuk mengatasinya, dapat memanfaatkan rGH karena menunjukkan fungsi yang sama dengan GH *endogenous* yang terdapat dalam tubuh ikan. Perbanyak GH dapat dilakukan dengan menyisipkan vektor yang mengandung sekuens GH suatu spesies tertentu ke dalam bakteri *Escherichia coli*. Di dalam bakteri tersebut, GH akan diekspresikan dan diperbanyak dengan cepat sesuai dengan kecepatan *E. coli* membelah diri. Hormon yang dihasilkan dari perbanyak tersebut dapat diaplikasikan untuk memacu pertumbuhan ikan, baik dengan cara injeksi maupun melalui pemberian pakan yang telah dicampur dengan hormon tersebut.

Pada penelitian ini, protein rGH ikan mas diproduksi dengan teknologi protein rekombinan melalui bakteri *E. coli*. Tujuan penelitian ini adalah menguji bioaktivitas rGH dengan cara mengamati pertumbuhan benih ikan mas yang diinjeksi dengan rGH dan dibandingkan dengan ikan yang diinjeksi dengan protein dari vektor pCold I tanpa fragmen DNA GH. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi solusi untuk meningkatkan laju pertumbuhan ikan-ikan komoditas budidaya. Peningkatan laju pertumbuhan dapat meningkatkan produktivitas akuakultur.

METODE PENELITIAN

Kloning Fragmen DNA GH *Mature*

Fragmen DNA penyandi GH matang ikan mas (*mCcGH*) diisolasi dari cDNA *full-length* GH ikan mas yang ada dalam plasmid pGEM-T Easy (koleksi laboratorium) menggunakan metode PCR. Amplifikasi PCR menggunakan primer *forward CcGHMP-F* (5'-GGATCC TCA GAC AAC CAG CGG CTC TTC-3') dan *reverse CcGHP-R* (5'-GTTCGAC CTA CAG GGT GCA GTT GGA ATC CAG-3'). Nukleotida yang diberi garis bawah merupakan situs restriksi *BamH I* dan *Sal I* yang berguna dalam proses pembuatan vektor ekspresi. Proses PCR menggunakan program denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit; (94°C selama 30 detik; 67°C selama 30 detik; 72°C selama 1 menit) sebanyak 35 siklus; dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 3 menit. Untuk mengklarifikasi hasil PCR, selanjutnya dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 0,7%. Panjang fragmen DNA penyandi *mCcGH* sepanjang 579 bp. Fragmen DNA produk PCR dipurifikasi dan selanjutnya diligasi ke vektor kloning pGEM-T Easy, ditransformasikan ke bakteri kompeten *E. coli* DH5 α dan diperbanyak secara *in vivo* (Sambrook dan Russel, 2001).

Pembuatan vektor ekspresi dan produksi rGH

Plasmid pGEM-T Easy yang mengandung fragmen DNA penyandi GH *mature* ikan mas diisolasi dari bakteri *E. coli* DH5 α menggunakan GF-1 *Plasmid DNA Extraction Kit* (Vivantis). Plasmid didigesti dengan menggunakan enzim *BamH I* dan *Sal I* untuk mengisolasi fragmen *mCcGH*, dan selanjutnya *mCcGH* diligasikan ke dalam vektor pCold I sebagai vektor ekspresi protein. Plasmid C-*mCcGH* yang terbentuk kemudian ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* DH5 α untuk diperbanyak secara *in vivo*. Plasmid yang sudah diperbanyak tersebut selanjutnya diisolasi dari bakteri *E. coli* DH5 α , kemudian ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* BL21 sebagai penghasil rGH.

Bakteri BL21 yang mengandung plasmid C-*mCcGH* ikan mas kemudian dikultur pada

media 2xYT, diinduksi dengan IPTG pada suhu inkubasi 15°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri dipanen dan kemudian disonikasi untuk mengeluarkan badan inklusi dari sel bakteri. Badan inklusi yang mengandung protein rGH ikan mas kemudian dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE untuk mengetahui kandungan proteinnya.

Pengujian bioaktivitas protein rGH

Benih ikan mas dengan bobot $5,15 \pm 0,4$ g diinjeksi secara intramuskular dengan 10 μ l PBS yang mengandung protein rGH dari 1 μ g sel bakteri per g ikan mas dan protein dari pCold I tanpa fragmen *mGH*. Injeksi dilakukan sebanyak 1 kali per minggu selama 4 minggu. Bobot ikan diukur seminggu sekali selama 2 bulan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi vektor ekspresi protein rGH

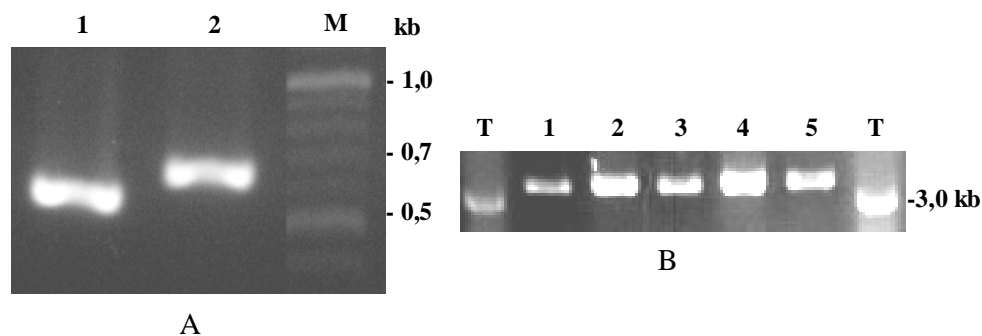
Amplifikasi PCR dengan primer spesifik untuk mengisolasi fragmen DNA *mGH* ikan mas menghasilkan pita DNA dengan ukuran 579 kb (Gambar 1, A). Plasmid T-*mCcGH* yang tersusun atas fragmen DNA *mGH* dan pGEM-T easy memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan pGEM-T easy (Gambar 1, B). Hal ini menunjukkan bahwa ligasi dan transformasi plasmid telah berhasil dilakukan.

Plasmid T-*mCcGH* yang didigesti menggunakan enzim *BamH* I dan *Sal* I menghasilkan satu fragmen DNA yang memiliki ukuran sama dengan produk PCR (Gambar 2, A). Hal ini menunjukkan bahwa fragmen DNA yang ada dalam plasmid T-*mCcGH*

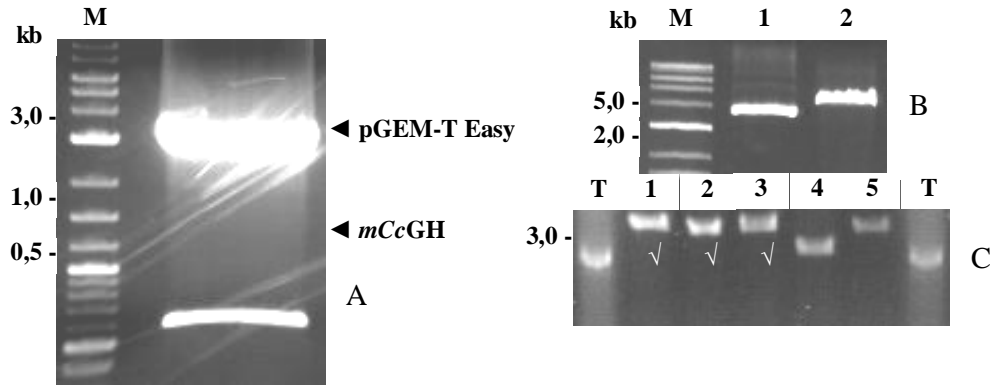
merupakan produk PCR yang telah diligasi dengan pGEM-T Easy. Plasmid pCold I juga didigesti dengan enzim yang sama dan menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran terlihat lebih besar dibandingkan dengan plasmid pCold-I (Gambar 2, B). Perbedaan ukuran tersebut disebabkan karena pCold I hasil digesti adalah berbentuk linear yang memiliki mobilitas dalam gel agarosa lebih lambat dibandingkan pCold I yang berbentuk sirkular. Selanjutnya, plasmid hasil ligasi antara fragmen *mCcGH* dan pCold-I memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan vektor pGEM-T Easy (T) dan pCold-I yang tidak berhasil terligasi dengan *mCcGH* (Gambar 2, C, klon no. 4). Hal ini menunjukkan bahwa pembuatan vektor ekspresi C-*mCcGH* dapat dikatakan berhasil.

Plasmid C-*mCcGH* disekuensing untuk menentukan klon bakteri yang membawa fragmen DNA penyandi *mGH* dengan sekuen yang benar. Berdasarkan hasil sekuensing, didapatkan dua klon bakteri dengan urutan nukleotida yang benar. Selanjutnya, plasmid C-*mCcGH* dengan urutan nukleotida yang benar ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* BL21. Hasil identifikasi klon bakteri menggunakan metode *cracking* menunjukkan banyak kandidat klon yang membawa plasmid C-*mCcGH* (Gambar 3, B).

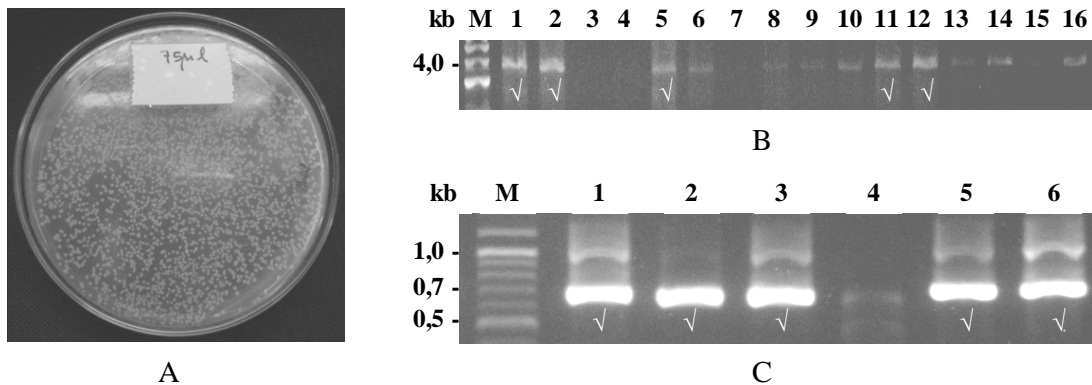
Verifikasi lanjut menggunakan metode PCR dengan primer *forward* dari sekuen pCold I dan primer *reverse* dari *mCcGH* menghasilkan pita DNA jelas dengan ukuran sekitar 650 bp (Gambar 3, C). Hasil ini



Gambar 1. Produk PCR fragmen DNA penyandi GH *mature* dan *full-length* (A) dan hasil *cracking* bakteri *E. coli* DH5 α yang membawa plasmid T-*mCcGH* (B); pada gambar A, 1= *mCcGH*, 2= GH *full-length*, dan M= marker; pada gambar B, 1-5= koloni bakteri *E. coli*, T= vektor pGEM-T Easy tanpa insersi (3,0 kb)



Gambar 2. Hasil digesti plasmid T-*mCcGH* (A), digesti vektor pCold I (B), dan *cracking* klon bakteri *E. coli* DH5 α yang diduga membawa plasmid C-*mCcGH* (C); pada gambar A, huruf M merupakan marker dan tanda panah menunjukkan vektor pGEM-T Easy dan fragmen DNA penyandi GH *mature* ikan mas yang sudah didigesti. Pada gambar B, M= marker, 1= vektor pCold I yang tidak didigesti, 2= vektor pCold I yang didigesti dengan enzim *Bam*H I dan *Sal* I; pada gambar C, T= vektor pGEM-T Easy tanpa insersi, 1-5= hasil *cracking* klon bakteri *E. coli* DH5 α , dan \surd = klon bakteri yang tersisipi C-*mCcGH*.



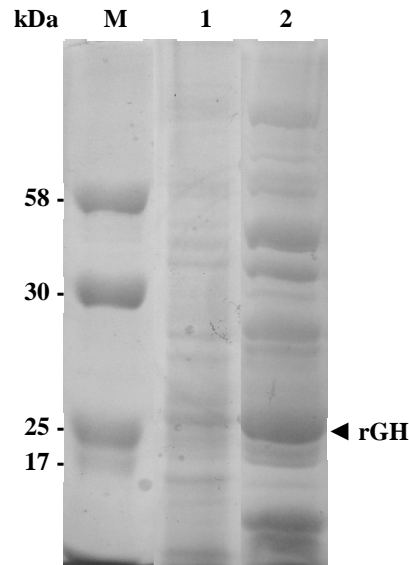
Gambar 3. Hasil transformasi plasmid C-*mCcGH* ke dalam *E. coli* BL21 (A), hasil *cracking* C-*mCcGH* dari bakteri *E. coli* BL21 (B), dan hasil uji orientasi fragmen *mCcGH* pada vektor pCold I (C); pada gambar B, M= marker, 1-16= hasil *cracking* klon bakteri *E. coli* BL21 (DE3), \surd = klon bakteri *E. coli* BL21 (DE3) yang tersisipi oleh C-*mCcGH*; pada gambar C, M= marker, 1-6= hasil PCR klon bakteri *E. coli* BL21 (DE3), \surd = klon bakteri *E. coli* BL21 (DE3) dengan orientasi C-*mCcGH* yang benar.

memastikan bahwa klon-klon bakteri BL21 memang telah membawa plasmid C-*mCcGH*.

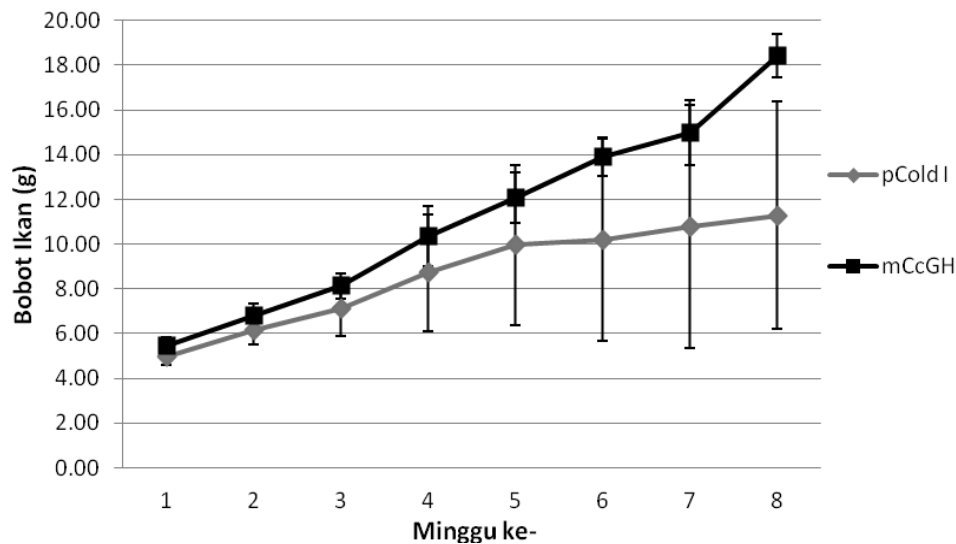
Produksi dan uji bioaktivitas protein rGH

Klon bakteri *E. coli* BL21 yang membawa fragmen *mCcGH* ditumbuhkan pada media 2xYT yang mengandung ampicilin dan isopropylbetathio galactopyranoside (IPTG) untuk memproduksi protein rGH. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan pita protein pada posisi 25 kDa (Gambar 4, tanda kepala panah), yang diduga merupakan protein rGH ikan mas. Berbeda dengan protein yang dihasilkan dari bakteri *E. coli*

BL21 (DE3) yang membawa pCold I tanpa *insersi*, tampak tidak ada protein pada ukuran 25 kDa. Tetapi, protein lain yang diproduksi relatif sama. Berat molekul protein yang dihasilkan lebih besar dari rGH yang diprediksi berdasarkan asumsi, yaitu 21 kDa. Hal ini karena adanya penambahan ukuran dari *His Tag* yang terdapat di dalam vektor pCold I (Chan *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil tersebut, bisa disimpulkan bahwa protein rGH ikan mas telah berhasil diproduksi. Dari 200 ml media kultur dapat dihasilkan sekitar 0,93 g pelet bakteri yang mengandung rGH. Dari pelet



Gambar 4. Hasil SDS-PAGE protein rGH (hormon pertumbuhan); M= marker, 1= protein dari bakteri *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa pCold I tanpa insersi, 2= protein dari bakteri *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa plasmid C-*mCcGH*; tanda panah menunjukkan protein rGH ikan mas; angka di sebelah kiri menunjukkan ukuran marker.



Gambar 5. Bobot ikan mas yang disuntikkan dengan pCold I tanpa insersi dan rGH ikan mas yang dipelihara selama 8 minggu. Dosis penyuntikkan 1 μ g GH/10 μ l PBS/g bobot tubuh/minggu selama 4 minggu.

bakteri yang diproduksi, diperkirakan ada sebanyak sekitar 10,51% protein rGH dari total protein yang dihasilkan (diprediksi dengan menggunakan program Totallab TL 120). Tingkat produksi protein rGH tersebut mirip dengan yang dilaporkan oleh Cheng (1995), yaitu sekitar 8-10% dari total protein yang dihasilkan.

Bioaktivitas rGH ikan mas yang diproduksi diketahui dengan membandingkan pertumbuhan mutlak ikan mas yang disuntik rGH ikan mas dan ikan mas yang disuntikkan dengan pCold I tanpa insersi. Dari Gambar 5. dapat terlihat bahwa ikan mas yang disuntikkan dengan rGH ikan mas memiliki pertumbuhan yang lebih besar bila dibandingkan dengan ikan mas yang disuntikkan

dengan pCold I tanpa insersi. Hal ini menandakan bahwa rGH ikan mas yang diproduksi aktif dan dapat memacu pertumbuhan ikan mas.

Pada akhir penelitian, penyuntikkan rGH ikan mas meningkatkan pertumbuhan bobot ikan mas sekitar 100% bila dibandingkan dengan ikan mas yang disuntikkan dengan pCold I tanpa insersi. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan pada ikan *flounder*, 24% (Jeh *et al.*, 1998), juvenil ikan *gilthead seabream*, 29-33% (Ben-Atia *et al.*, 1999), dan ikan mas koki, 43% (Promdonkoy *et al.*, 2004). Tetapi lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Mahmoud *et al.* (1998) pada ikan mas yaitu 120% dan Acosta *et al.* (2007) pada ikan nila, yaitu 171%. Perbedaan peningkatan pertumbuhan tersebut diduga terkait dengan jenis dan ukuran ikan uji, sumber GH yang digunakan, dan metode pemberian GH.

Peningkatan pertumbuhan ikan mas yang disuntik rGH memberikan alternatif untuk meningkatkan produktivitas ikan budidaya. Namun demikian, untuk kemudahan dalam aplikasinya, perlu dilakukan pengembangan teknik pemberian rGH yang lebih praktis dan bisa dilakukan pada ikan dalam jumlah yang banyak dalam waktu relatif cepat.

KESIMPULAN

Protein rGH ikan mas telah berhasil diproduksi dengan menggunakan vektor pCold I dan memiliki bioaktivitas dalam memacu pertumbuhan ikan mas sekitar 100%.

DAFTAR PUSTAKA

- 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, 1671–1676.
- Anathy, V., Venugopal, T., Koteeswaran, R., Pandian, T.J., Mathavan, S., 2001. Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding growth hormone from Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). *Journal of Bioscience* 26, 315–324.
- Beardmore, J.A., Porter, J.S., 2003. Genetically Modified Organisms and Aquaculture. FAO Fisheries Circular, Roma.
- Ben-Atia, I., Fine, M., Tandler, A., Funkenstein, B., Maurice, S., Cav-ari, B., Gertler, A., 2000. Preparation of recombinant gilthead sea-bream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 155–164.
- Chan, Y.H., Cheng, C.H.K., Chan, K.M., 2003. Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and -II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135, 613–624.
- Cheng, C.M., 1995. A Study on a Recombinant Teleostean Growth Hormone [disertasi]. Maryland: University of Maryland Baltimore County.
- Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A., McBride, J.R., 1979. Hormonal enhancement of growth. Di dalam: Hoar WS, Randall DJ, dan Brett JR, editor. *Fish Physiology Vol. 8, Bioenergetics and Growth*. Academic Press, California.
- Jeh, H.S., Kim, C.H., Lee, H.K., Han, K., 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: over-expression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *Journal of Biotechnology* 60, 183–193.
- Li, Y., Bai, J., Jiana, Q., Yea, X., Laoa, 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.
- Lutz, C.G., 2001. *Practical Genetics for Aquaculture*. Fishing News Book, Oxford.
- Mahmoud, S.S., Wang, S., Moloney, M.M., Habibi, H.R., 1998. Production of a biologically active novel goldfish growth hormone in *Escherichia coli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 120, 657–663.
- Mahmoud, S.S., 1999. Production of recombinant carp growth hormone in the seed of

- Brassica napus* [dissertation]. Alberta: Department of Biological Sciences, University of Calgary.
- Promdonkoy, B., Warit, S., Panyim, S., 2004. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish (*Pangasionodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Lett.* 26, 649–653.
- Roberts, S., Barry, T., Malison, J., Goetz, F., 2004. Production of a recombinantly derived growth hormone antibody and the characterization of growth hormone levels in yellow perch. *Aquaculture* 232, 591–602.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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. Nati. Acad. Sci* 82, 4306–4310.