



UNIVERSITAS INDONESIA

**REKONSTRUKSI PRIMER *POLYMERASE CHAIN
REACTION* (PCR) SPESIFIK UNTUK GEN TRANSFERIN
PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

SKRIPSI

**RIZKY PRIAMBODO
0706264293**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**REKONSTRUKSI PRIMER *POLYMERASE CHAIN
REACTION* (PCR) SPESIFIK UNTUK GEN TRANSFERIN
PADA IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**RIZKY PRIAMBODO
0706264293**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
DESEMBER 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Rizky Priambodo

NPM : 0706264293

Tanda Tangan : 

Tanggal : 29 Desember 2011

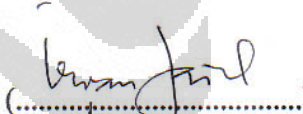
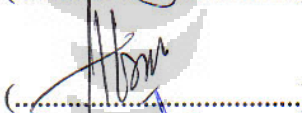
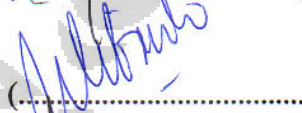

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Rizky Priambodo
NPM : 0706264293
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Rekonstruksi Primer *Polymerase Chain Reaction*
(PCR) Spesifik untuk Gen Transferin pada Ikan Nila
(*Oreochromis niloticus*)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi S1 Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Irvan Faizal, M.Eng (.....) 
Pembimbing II : Dr. Abinawanto (.....) 
Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....) 
Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. (.....) 

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 29 Desember 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan segala nikmat-Nya bagi Penulis, sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam juga tak lupa senantiasa dipanjatkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa manusia menuju kehidupan yang lebih baik. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI).

Skripsi ini tercipta berkat bantuan yang diberikan oleh beberapa pihak kepada Penulis. Oleh karena itu, Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Irvan Faizal, M.Eng dan Dr. Abinawanto, selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing, memberi nasihat, semangat dan saran bagi Penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih atas kesabaran, waktu, dukungan, dan semangat yang diberikan sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Penguji I dan II yang telah memberikan saran, perbaikan, dukungan, dan kritik kepada Penulis dalam pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Setiorini, M.Kes. selaku Koordinator Seminar, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan seluruh dosen Departemen Biologi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada Penulis selama menempuh pendidikan di Biologi. Terima kasih juga kepada seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, terutama Mbak Asri, Ibu Ida, Pak Taryana, Pak Taryono dan Ibu Rusmalina atas segala bantuan yang telah diberikan.
4. Ayah, Ibu, Kakek, Nenek, Bude Rahayu, Mbak Ria, Mas Rio, Mbak Ika, dan seluruh keluarga besar Penulis yang telah membantu baik secara moril maupun materil. Terima kasih telah meluangkan waktu, tenaga, materi, serta

memberikan semangat, doa dan perhatian kepada Penulis selama penulisan skripsi ini.

5. Ir. Nenie Yustiningsih, M.Sc, selaku Direktur Pusat Teknologi Produksi Pertanian BPPT yang telah memberikan ijin kepada Penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bioakuakultur BPPT. Terima kasih juga kepada Dr. Suhendar I. Sachoemar, Dr. Iding Chaidir, Dr. Ratu Siti Aliyah, Dr. Husni Amarullah, Ir. Doddy Irawan, M.Sc, Ir. Sanityaning Irawati, Ir. Kusmiyati, dan Wisnu Sujatmiko, M.Si, selaku staff Laboratorium Bioakuakultur BPPT yang telah memberikan sambutan hangat dan motivasi bagi Penulis.
6. Mas Bagus, Mbak Tanti, Mbak Novi, Mbak Kiki, Mas Yogi, Mas Deni, Pak Ayub, Mas Rahmat, Mas Rizki, Mbak Delfi, Mbak Leha, dan Mbak Anna yang telah membantu dan memberikan semangat bagi Penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Bioakuakultur BPPT.
7. Ferissa Perwitari terima kasih atas segala perhatian, kebersamaan, dan doa bagi Penulis. Seluruh teman-teman Biologi angkatan 2007 (BLOSSOM), terutama Bayu, Karno, Fajar, Ikrimah, Maridha, Fika, dan Tiwi atas semua suka, duka, semangat, perhatian, waktu, tenaga, pengalaman, dan persaudaraan yang telah diberikan kepada Penulis.

Penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran sangat diharapkan demi kemajuan di masa depan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 29 Desember 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizky Priambodo
NPM : 0706264293
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Rekonstruksi Primer *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Spesifik untuk Gen Transferin pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 29 Desember 2011
Yang menyatakan



(Rizky Priambodo)

ABSTRAK

Nama : Rizky Priambodo
Program studi : Biologi
Judul : Rekonstruksi Primer *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Spesifik untuk Gen Transferin pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Transferin merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam transportasi zat besi dalam darah dan dapat mampu menyebabkan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) hidup pada rentang salinitas yang cukup besar. Penelitian bertujuan merekonstruksi primer PCR spesifik untuk gen transferin pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Gen transferin yang diuji berasal dari 10 *strain* ikan nila yang mewakili populasi ikan nila di Indonesia. Hasil PCR gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam kemudian diklona dan disekuensing. Sekuen DNA yang didapatkan dihomologikan dengan sekuen gen transferin yang terdapat pada *gene bank*. Hasil homologi menunjukkan adanya daerah yang *conserved* sebesar 83 pb. Primer didesain untuk mengamplifikasi fragmen gen transferin tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer TrfNF dan TrfNR mampu mengamplifikasi gen transferin dari 10 *strain* ikan nila.

Kata kunci : Ikan nila, PCR, primer, transferin
xiii + 85 halaman : 16 gambar; 2 tabel
Daftar referensi : 49 (1980--2011)

ABSTRACT

Name : Rizky Priambodo
Study Program: Biology
Title : Specific Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer
Reconstruction for Transferrin Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Transferrin is one of many factors that makes Nile Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) can live in very wide salinity range. The purpose of this research is to reconstruct specific primer for transferrin gene in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). The transferrin gene was taken from 10 variant of Nile Tilapia fish which represent the population of Nile Tilapia fish in Indonesia. The result from amplification process of transferrin gene from Nile Tilapia variant GESIT, Red Nifi, and Selfam was cloned and was sequenced. The result of sequencing process was arranged to find the conserved region. The conserved region has found and the size is 83 bp. PCR primer was designed to amplify transferrin gene fragmen. The result of this research is TrfNF primer and TrfNR primer can amplify transferrin gene from 10 variant Nile Tilapia fish.

Key words : Nile Tilapia fish, PCR, primer, transferrin
xiii + 85 pages: 16 pictures; 2 table
Bibliography : 49 (1980--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Ikan Nila	3
2.2 Gen Transferin	5
2.3 Desain Primer	7
2.4 Vektor plasmid pGEM [®] -T <i>easy</i>	8
2.5 Sel kompeten <i>E. coli</i> DH5 α	9
2.6 Teknik Molekuler	10
2.6.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	10
2.6.2 Elektroforesis	11
2.6.3 Ligasi	12
2.6.4 Transformasi Gen	13
2.6.5 Pengklonaan	13
2.6.6 Seleksi vektor rekombinan hasil pengklonaan	14
2.6.7 Sekuensing	14
3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	16
3.2 Alat	16
3.3 Bahan	17
3.3.1 Objek penelitian	17
3.3.2 Pemeliharaan	17
3.3.3 Bahan habis pakai	18
3.4 Skema Kerja Penelitian	20
3.5 Cara Kerja	
3.5.1 Pembuatan larutan/ <i>buffer</i>	21
3.5.2 Pembuatan medium	21
3.5.3 Ekstraksi DNA genom ikan nila	21
3.5.4 Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA	22
3.5.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	22
3.5.6 Elektroforesis	23
3.5.7 Ekstraksi DNA dari fragmen gel agarosa	23

3.5.8	Ligasi	24
3.5.9	Pembuatan sel kompeten <i>E.coli</i> DH5 α	25
3.5.10	Transformasi	25
3.5.11	Isolasi DNA rekombinan	26
3.5.12	Digesti DNA	27
3.5.13	Sekuensing	27
3.5.14	Desain primer	27
3.5.15	Optimasi PCR	28
3.5.16	Pengujian primer PCR	28
3.5.17	Pengukuran tingkat ekspresi gen transferin.....	28
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Hasil	29
4.1.1	Isolasi DNA ikan	29
4.1.2	Optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1.....	30
4.1.3	Amplifikasi dan ekstraksi gel gen transferin dari cDNA ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi dan DNA genom ikan nila <i>strain</i> Selfam	31
4.1.4	Transformasi gen transferin ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi, dan Selfam	34
4.1.5	Isolasi plasmid	36
4.1.6	Sekuensing dan analisis sekuensing	37
4.1.7	Desain primer	38
4.1.8	Optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR	39
4.1.9	Pengujian primer TrfNF dan TrfNR	40
4.2	Pembahasan	42
4.2.1	Isolasi DNA ikan	42
4.2.2	Optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1.....	43
4.2.3	Amplifikasi dan ekstraksi gel gen transferin dari cDNA ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi dan DNA genom ikan nila <i>strain</i> Selfam	44
4.2.4	Transformasi gen transferin ikan nila <i>strain</i> GESIT, Red Nifi, dan Selfam	44
4.2.5	Isolasi plasmid	46
4.2.6	Sekuensing dan analisis sekuensing	46
4.2.7	Desain primer	48
4.2.8	Optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR	49
4.2.9	Pengujian primer TrfNF dan TrfNR	50
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1	Kesimpulan	52
5.2	Saran	52
	DAFTAR REFERENSI	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	4
Gambar 2.2.	Mekanisme kerja transferin	6
Gambar 2.3.	Struktur vektor pGEM [®] -T <i>easy</i>	9
Gambar 2.4.	Siklus PCR	10
Gambar 3.3.2.	Bak tempat pemeliharaan ikan	18
Gambar 3.4.	Skema alur kerja penelitian	20
Gambar 4.1.1.	Hasil elektroforesis DNA ikan	30
Gambar 4.1.2.	Hasil optimasi PCR gen transferin dengan menggunakan primer TRF F2 dan TRF R1	31
Gambar 4.1.3.	Hasil PCR gen transferin dari cDNA dan DNA genom ikan nila	32
Gambar 4.1.4.	Hasil elektroforesis gen transferin sebelum proses ekstraksi dari gel (A) dan sesudah proses ekstraksi dari gel (B)	33
Gambar 4.1.5.	Hasil transformasi gen transferin	34
Gambar 4.1.6.	Hasil visualisasi <i>insert checking</i> hasil pengklonaan gen transferin	35
Gambar 4.1.7.	Hasil elektroforesis isolasi plasmid	36
Gambar 4.1.8.	Hasil digesti gen transferin dalam vektor pGEM [®] -T <i>easy</i>	37
Gambar 4.1.9.	Hasil elektroforesis optimasi PCR primer TrfNF dan primer TrfNR	40
Gambar 4.1.10.	Hasil elektroforesis pengujian primer TrfNF dan primer TrfNR	41

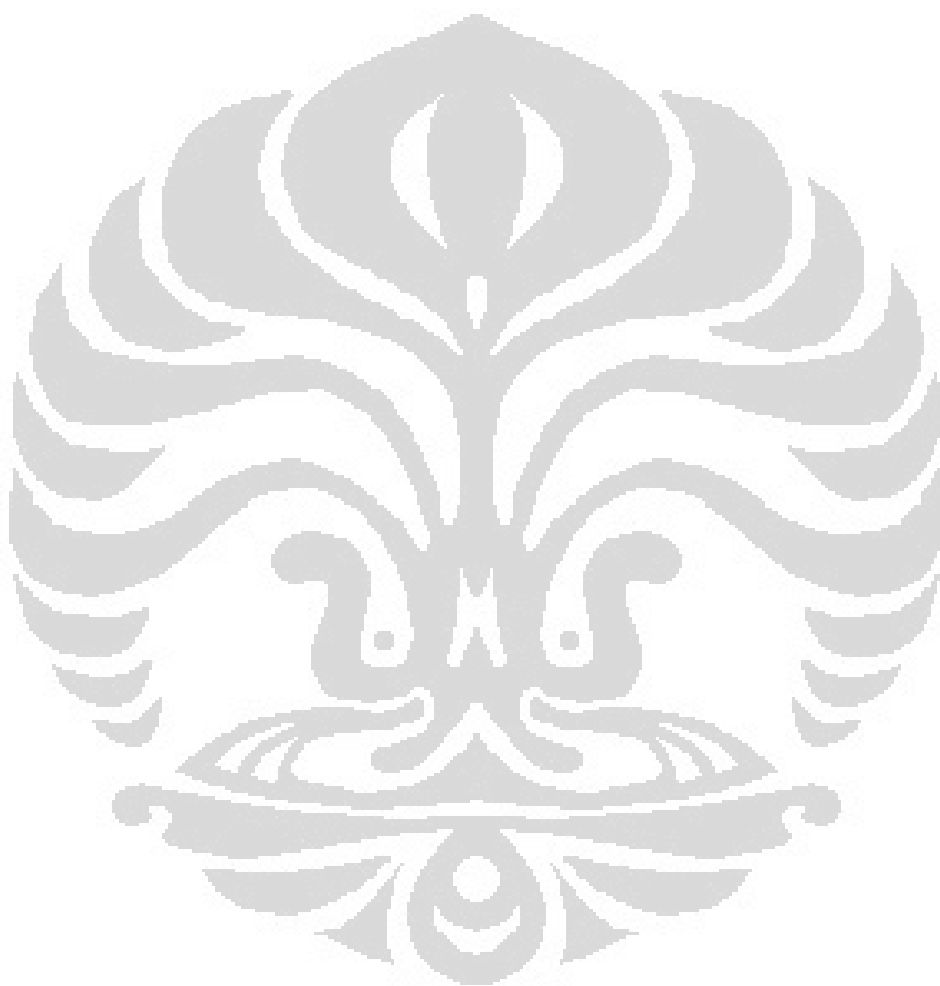
DAFTAR TABEL

Tabel 3.3.1.	Sumber ikan nila yang digunakan dalam penelitian	17
Tabel 4.1.1.	Hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA ikan	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Komposisi dan preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian	58
Lampiran 2	Primer yang digunakan dalam penelitian	60
Lampiran 3	Komposisi dan cara pembuatan medium SOB dan SOC	61
Lampiran 4	Komposisi reaksi PCR untuk mengamplifikasi gen transferin	62
Lampiran 5	Komposisi reaksi PCR uji primer untuk mengamplifikasi gen transferin	62
Lampiran 6	Komposisi reaksi digesti ampikon gen transferin	63
Lampiran 7	Komposisi reaksi ligasi gen transferin	63
Lampiran 8	Program optimasi PCR gen transferin dengan primer TRF F2 dan TRF R1	63
Lampiran 9	Program PCR gen transferin dengan primer TRF F2 dan primer TRF R1	64
Lampiran 10	Program optimasi PCR gen transferin dengan primer TrfNF dan primer TrfNR	64
Lampiran 11	Program PCR gen transferin dengan primer TrfNF dan primer TrfNR	64
Lampiran 12	Perhitungan nilai efisiensi transformasi	65
Lampiran 13	Hasil pengukuran tingkat ekspresi gen transferin ikan nila dan ikan mujair dengan perangkat lunak UN-SCAN-IT <i>Gel Analysis</i>	66
Lampiran 14	Hasil sekuensing gen transferin ikan nila <i>strain</i> GESIT.....	67
Lampiran 15	Hasil sekuensing gen transferin ikan nila <i>strain</i> Red Nifi	68
Lampiran 16	Hasil sekuensing gen transferin ikan nila <i>strain</i> Selfam	69
Lampiran 17	Hasil <i>blastn</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> GESIT	70
Lampiran 18	Hasil <i>blastn</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> Red Nifi ...	71
Lampiran 19	Hasil <i>blastn</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> Selfam	72
Lampiran 20	Hasil <i>blastx</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> GESIT	73
Lampiran 21	Hasil <i>blastx</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> Red Nifi ...	74
Lampiran 22	Hasil <i>blastx</i> gen transferin ikan nila <i>strain</i> Selfam	75
Lampiran 23	Hasil homologi gen transferin pada ikan nila	76
Lampiran 24	Hasil homologi asam amino gen transferin pada ikan nila	77
Lampiran 25	Hasil persentase GC, nilai <i>melting temperature</i> (T _m) dan struktur <i>hairpin</i> primer TrfNF	78
Lampiran 26	Hasil persentase GC, nilai <i>melting temperature</i> (T _m) dan struktur <i>hairpin</i> primer TrfNR	79
Lampiran 27	Hasil uji struktur <i>dimer</i> primer TrfNF	80
Lampiran 28	Hasil uji struktur <i>dimer</i> primer TrfNR	81

Lampiran 29	Hasil uji struktur <i>cross dimer</i> primer TrfNF dan primer TrfNR 82
Lampiran 30	Hasil uji struktur <i>palindrome</i> primer TrfNF 83
Lampiran 31	Hasil uji struktur <i>palindrome</i> primer TrfNR84
Lampiran 32	Hasil primer BLAST85



BAB 1 PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu ikan air tawar yang dimanfaatkan sebagai ikan konsumsi di Indonesia. Struktur daging ikan nila yang padat menjadikan ikan nila sebagai salah satu pilihan konsumsi. Ikan nila merupakan ikan yang relatif mudah dibudidayakan (Prihatman 2000: 1--2). Hal tersebut disebabkan karena ikan nila tergolong ke dalam kelompok ikan *euryhaline*, yaitu kelompok ikan yang memiliki tingkat toleransi salinitas yang cukup besar (Wurts 1998: 65). Sebagian besar ikan nila masih dibudidayakan di air tawar, walaupun ikan nila memiliki potensi untuk hidup di air payau atau bahkan air laut. Pemanfaatan perairan payau di Indonesia belum dimanfaatkan secara maksimal (Yin *dkk.* 2002: 2). Pemanfaatan perairan payau di Indonesia dapat dimaksimalkan dengan cara menjadikan perairan payau tersebut sebagai tempat budidaya kelompok ikan *euryhaline*, seperti ikan nila.

Transferin merupakan protein yang berperan penting dalam proses transportasi zat besi dalam tubuh (Sanz *dkk.* 2010: 844). Zat besi (ion Fe^{3+}) nantinya akan dimanfaatkan sebagai kofaktor enzim pada proses pembentukan ATP di dalam mitokondria. Transferin diduga memiliki peranan penting bagi kemampuan ikan *euryhaline*, termasuk ikan nila, untuk dapat bertahan hidup pada rentang salinitas yang cukup luas. Tingkat ekspresi gen transferin akan cenderung meningkat seiring dengan perubahan salinitas pada habitat ikan nila. Peningkatan ekspresi transferin tersebut merupakan salah satu mekanisme untuk menghasilkan ATP yang lebih banyak, sehingga ikan nila mampu bertahan pada perubahan salinitas yang terjadi (Zalups & Koropatnick 2010: 170).

Penelitian tentang ikan *euryhaline* telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Ridha (2008: 375) melaporkan bahwa ikan nila (*O. niloticus*) dan ikan nila (*O. niloticus*) strain *Genetically Improved Farmed Tilapia* (GIFT) mampu dibudidayakan pada air payau sampai konsentrasi salinitas 20 ppt. Penelitian selanjutnya bahkan menunjukkan bahwa ikan nila strain merah dan *Genetically Supermale Indonesian Tilapia* (GESIT) dapat dibudidayakan pada air payau dengan konsentrasi salinitas sampai 35 ppt (Nugroho 2009: 42--43).

Kemampuan adaptasi ikan nila pada perairan payau antara lain dipengaruhi oleh gen transferin (Rengmark & Lingaas 2007: 148). Menurut Okumus & Ciftci (2003: 52), keberadaan gen transferin dapat dilacak dengan menggunakan primer spesifik. Nugroho (2008: belum dipublikasikan) telah berhasil mengkonstruksi primer untuk gen transferin yang didapat dari hasil homologi 4 sekuen gen transferin yang terdapat pada *gene bank*, yaitu sekuen gen transferin *O. niloticus* (DQ272465.1), *O. aureus variant 1* (AJ318861.1), *O. aureus variant 2* (AJ318862.1), dan *O. mossambicus* (AJ312311.1). Permasalahan pada penelitian adalah primer yang dikonstruksi oleh Nugroho belum diverifikasi dan masih belum spesifik. Oleh karena itu, penelitian bertujuan untuk merekonstruksi primer spesifik gen transferin untuk ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Hipotesis penelitian adalah primer spesifik gen transferin untuk ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berhasil direkonstruksi.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ikan Nila

Taksonomi ikan nila menurut *Integrated Taxonomy International System* (2010: 1) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Class : Actinopterygii
Ordo : Perciformes
Family : Cichlidae
Genus : *Oreochromis*
Spesies : *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).

Ikan nila merupakan salah satu kelompok ikan air tawar Indonesia. Ikan nila berasal dari benua Afrika dan baru pada tahun 1969 bibit ikan nila secara resmi didatangkan ke Indonesia oleh Balai Besar Penelitian Perikanan Air Tawar (BBPPAT). Pembudidayaan ikan nila umumnya dilakukan di kolam, danau, ataupun sungai. Ikan nila memiliki morfologi tubuh memanjang dengan warna sisik putih kehitaman. Morfologi ikan nila dapat dilihat pada Gambar 2.1. Ikan nila jantan memiliki ukuran tubuh yang lebih besar daripada ikan nila betina. Ikan nila memiliki laju pertumbuhan yang relatif cepat, yaitu sekitar 2 bulan untuk menjadi dewasa dan siap panen. Ikan nila dewasa mampu menghasilkan sel telur satu bulan sekali. Daging ikan nila mempunyai tekstur yang padat dan tebal. Hal tersebut menjadikan ikan nila menjadi salah satu ikan konsumsi di Indonesia (Prihatman 2000: 1--2).

Berdasarkan kemampuan toleransi terhadap tingkat salinitas, ikan terbagi atas 2 kelompok yaitu ikan *stenohaline* dan ikan *euryhaline*. Ikan *stenohaline* merupakan kelompok ikan yang memiliki rentang toleransi salinitas yang sempit. Kelompok ikan tersebut tidak akan mampu bertahan hidup jika terjadi perubahan tingkat salinitas pada habitatnya. Contoh ikan dari kelompok *stenohaline* antara lain ikan mas dan ikan tuna. Ikan *euryhaline* merupakan kelompok ikan yang memiliki rentang toleransi salinitas yang luas. Kelompok ikan tersebut mampu

beradaptasi pada habitat yang memiliki perbedaan tingkat salinitas. Beberapa ikan dari kelompok *euryhaline* dapat melakukan migrasi dari perairan tawar ke perairan payau, dan laut. Contoh ikan dari kelompok *euryhaline* antara lain ikan nila, ikan mujair, ikan salmon, dan belut (Wurts 1998: 1).



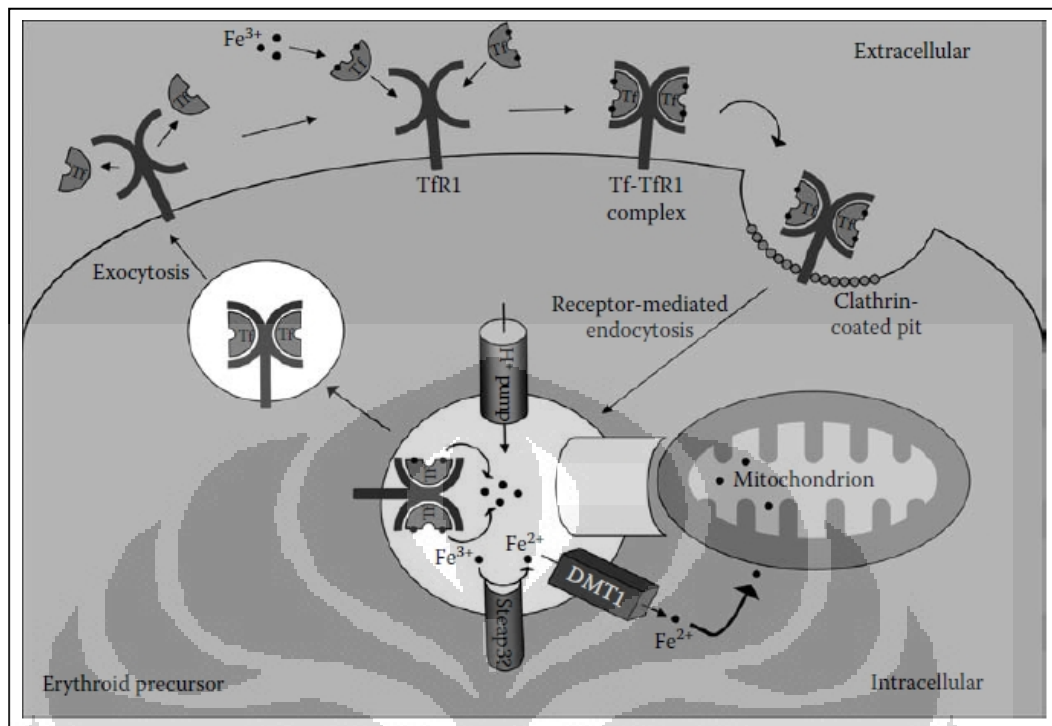
Gambar 2.1 Ikan nila (*Oreochromis niloticus*)
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Ikan nila yang dibudidayakan di Indonesia terdiri atas beberapa *strain*, antara lain GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, JICA, dan Larasati. Ikan nila *Genetically Supermale Indonesian Tilapia* (GESIT) merupakan ikan nila hasil rekayasa genetik yang dilakukan oleh Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Tawar (BBPBAT) Sukabumi dengan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT). Ikan nila GESIT memiliki kromosom kelamin jantan YY, sehingga akan menghasilkan keturunan ikan jantan dengan kromosom XY. Ikan nila Red Nifi merupakan salah satu *strain* ikan nila yang berasal dari Thailand dan diintroduksi ke Indonesia pada tahun 1981. Ikan nila Selfam merupakan salah satu *strain* ikan nila yang berasal dari hasil seleksi famili oleh BBPBAT Sukabumi. Ikan nila *Bogor Enhanced Strain Tilapia* (BEST) merupakan salah satu hasil rekayasa dan pemuliaan ikan nila yang dilakukan oleh Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor. Ikan nila Chitra Lada merupakan *strain* ikan nila yang berasal dari Thailand dan dibudidayakan oleh Balai Benih Ikan (BBI) di Jawa Tengah tahun 2001. Ikan nila *strain* Umbulan merupakan ikan nila hasil rekayasa yang dilakukan oleh Unit Pelaksana

Teknis PBAT Umbulan Pasuruan. Ikan nila putih merupakan *strain* ikan nila yang berasal dari Kabupaten Sleman. Ikan nila putih tersebut kemudian diseleksi dan diperkaya dengan memasukkan gen warna dari ikan nila merah Filipina albino. Ikan nila *strain* Nirwana merupakan salah satu *strain* ikan nila hasil pengembangan dari Balai Pengembangan Benih Ikan Wanayasa di Purwakarta. Ikan nila *Genetically Improved Farmed Tilapia* (GIFT) merupakan *strain* ikan nila yang berasal dari Filipina dan masuk ke Indonesia pada tahun 1994. Ikan nila *Japan for International Cooperation Agency* (JICA) merupakan salah satu *strain* ikan nila hasil rekayasa genetik yang dilakukan oleh Balai Besar Budidaya Air Tawar Jambi. Ikan nila pada penelitian tersebut didatangkan dari lembaga riset *Kagoshima Fisheries Research Station* di Jepang (Direktorat Jendral Perikanan Budidaya 2011: 1; Sucipto 2010: 1).

2.2. Gen Transferin

Gen transferin merupakan suatu gen yang mengkode ekspresi protein transferin pada tubuh individu. Transferin merupakan suatu protein yang memiliki fungsi utama untuk transportasi zat besi dalam darah (Sanz *dkk.* 2010: 844). Fungsi lain dari transferin antara lain sebagai sistem imunitas, proliferasi sel, dan resistensi terhadap infeksi (Lee *dkk.* 1998: 287). Transferin sebagian besar dihasilkan oleh hati dan dialirkan melalui plasma darah. Transferin juga dihasilkan di organ lain, seperti pada otak. Ekspresi transferin pada otak dapat ditemukan pada ikan cod Atlantik (*Gadus morhua*). Transferin terbagi atas beberapa jenis, antara lain ovotransferin (OTF), lactotransferin (LTF), dan melanotransferin (MTF). Ovotransferin merupakan protein transferin yang diekspresikan pada sel telur, sedangkan lactotransferin diekspresikan pada susu. Lactotransferin berfungsi untuk mencegah proliferasi dari mikroba asing. Melanotransferin merupakan protein transferin yang diekspresikan dalam plasma darah (Rengmark & Lingaas 2007: 146).



Gambar 2.2 Mekanisme kerja transferin
 [Sumber: Zalups & Koropatnick 2010: 170]

Mekanisme kerja transferin dapat dilihat pada Gambar 2.2. Transferin di dalam tubuh berfungsi untuk mengikat zat besi (ion Fe^{3+}). Ikatan antara ion Fe^{3+} dan molekul transferin nantinya akan berikatan dengan reseptor transferin tipe 1 (TfR1) pada permukaan sel. Ikatan kompleks antara ion Fe^{3+} , transferin, dan reseptor transferin tersebut nantinya akan masuk ke dalam sel dengan mekanisme endositosis. Protein *clathrin* berfungsi untuk membantu pembentukan vesikel pada proses endositosis. Ion Fe^{3+} yang berada di dalam sel akan dilepaskan dari molekul transferin dan diubah menjadi ion Fe^{2+} dengan mekanisme pompa hidrogen. Ion Fe^{2+} tersebut nantinya akan dibawa oleh *Divalent Metal Transporter* tipe 1 (DMT1) ke dalam mitokondria. Ion Fe^{2+} berfungsi sebagai kofaktor enzim pada proses respirasi atau pembentukan ATP (Zalups & Koropatnick 2010: 170).

Mekanisme kerja transferin pada ikan terjadi pada sel yang terdapat di sekitar insang. Hal tersebut dikarenakan daerah insang pada ikan merupakan daerah tempat pertukaran ion dan udara. Ekspresi gen transferin pada ikan air tawar yang beradaptasi ke air laut akan cenderung mengalami peningkatan. Kadar

zat besi mungkin menghilang dari ikan sejalan dengan terjadinya mekanisme ekskresi. Hal tersebut memungkinkan peningkatan ekspresi gen transferin sebagai respon turunnya kadar zat besi, sehingga nantinya zat besi yang tersisa di dalam tubuh dapat berikatan dengan transferin dan tidak terbuang oleh tubuh (McKnight *dkk.* 1980: 150).

2.3. Desain Primer

Primer merupakan beberapa sekuen basa yang digunakan untuk membatasi daerah yang akan diamplifikasi pada proses PCR (McPherson *dkk.* 1991: 8). Primer akan menempel pada sekuen DNA tertentu, kemudian proses elongasi akan dimulai dengan bantuan enzim *Taq DNA polimerase*. Proses penempelan primer ditentukan oleh suhu *annealing*. Primer membutuhkan suhu yang tepat untuk dapat menempel pada sampel DNA yang akan diamplifikasi. Suhu *annealing* yang terlalu rendah akan mengakibatkan primer tidak menempel pada sekuen spesifik, sehingga akan terdapat beberapa pita DNA yang terbentuk. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi akan menyebabkan primer tidak dapat menempel pada sampel DNA, sehingga proses amplifikasi tidak terjadi. Suhu *annealing* untuk suatu primer dapat diprediksi dengan rumus sebagai berikut :

$$Td = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

Keterangan

- Td* = dissociation temperature (°C)
G = jumlah basa guanin (G) pada primer
C = jumlah basa sitosin (C) pada primer
A = jumlah basa adenin (A) pada primer
T = jumlah basa timin (T) pada primer

Primer PCR yang baik harus memenuhi beberapa persyaratan, antara lain berukuran 18 sampai 30 basa. Primer yang terlalu panjang dapat memperbesar

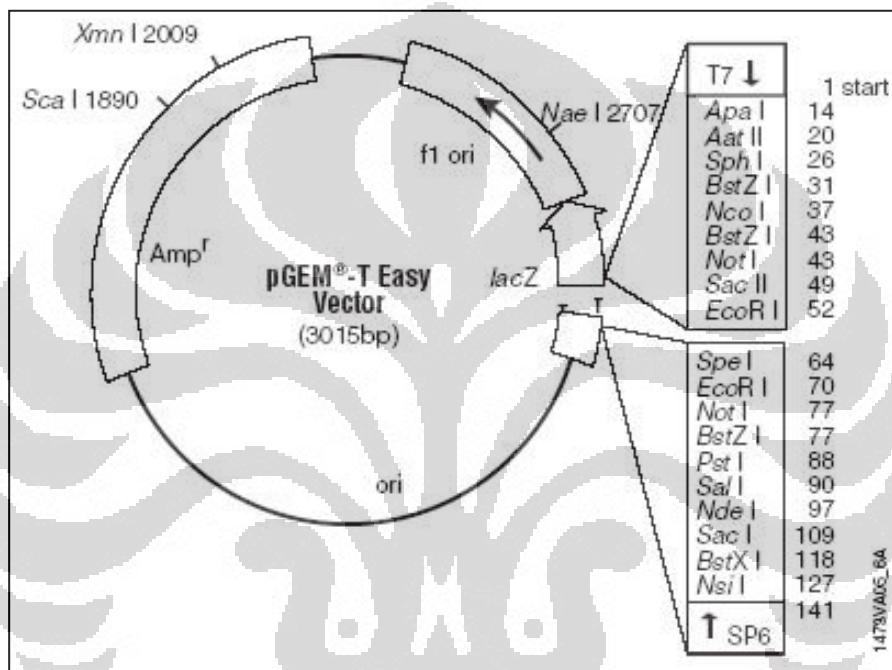
kemungkinan untuk terbentuknya dimer. Primer yang baik juga harus tidak saling berkomplemen agar tidak membentuk struktur *hairpin*. Struktur *hairpin* yang terbentuk pada suatu primer mengakibatkan primer tersebut tidak dapat menempel pada sekuen DNA sampel. Suhu optimal primer *forward* dan *reverse* juga harus hampir sama. Perbedaan suhu yang cukup jauh antara kedua primer tersebut dapat mengakibatkan hanya salah satu primer saja yang berfungsi (McPherson *dkk.* 1995: 8).

Proses pembuatan primer PCR beberapa tahun terakhir sudah melibatkan perangkat lunak tertentu. Perangkat lunak tersebut memiliki fungsi yang berbeda-beda, antara lain untuk menganalisis DNA target, memprediksi struktur sekunder primer, mendesain primer, analisis situs restriksi, serta pembuatan konstruksi plasmid. Perangkat lunak yang umumnya digunakan untuk mendesain primer antara lain adalah Primer3, Gene Fisher, PCR Designer, PrimerQuest, Rawprimer, dan lain-lain. Perangkat lunak yang berfungsi untuk memprediksi struktur sekunder primer yang telah dibuat antara lain adalah NetPrimer, Primer Premier, Oligo 6, Fast PCR, dan lain-lain. Perangkat lunak yang digunakan untuk membuat primer umumnya juga telah memberikan informasi tambahan seperti nilai *melting temperature* (T_m) primer, panjang produk PCR, lokasi penempelan primer pada sekuen DNA target, nilai persentase GC, serta berat molekular primer tersebut (Abd-Elsalam 2003: 91--93).

2.4. Vektor Plasmid pGEM[®]-T *easy*

Vektor plasmid pGEM[®]-T *easy* merupakan vektor pengklonan yang memiliki promotor T7 dan SP6 RNA polimerase yang mengapit daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) di dalam α -peptida yang mengode enzim β -galaktosidase. DNA sisipan yang tersisip pada daerah tersebut akan menginaktivasi pembentukan enzim β -galaktosidase. Hal tersebut menjadikan hasil klon akan dapat diseleksi pada medium penapisan biru putih. Vektor pGEM[®]-T *easy* juga memiliki situs pengikatan primer M13 *forward* dan *reverse* yang dapat digunakan pada saat proses sekuensing. Beberapa situs restriksi juga terdapat pada vektor pGEM[®]-T *easy*. Vektor tersebut juga didesain untuk memudahkan verifikasi

plasmid rekombinan melalui proses digesti menggunakan suatu enzim restriksi. Enzim restriksi seperti *EcoRI* dan *NotI* merupakan contoh enzim restriksi yang dapat digunakan dalam proses digesti menggunakan satu enzim restriksi untuk melepaskan DNA sisipan pada vektor pGEM[®]-T *easy*. Enzim restriksi tersebut memiliki dua situs restriksi pada kedua ujung 3' yang mengapit DNA sisipan (Gambar 2.3.) (Promega 2008: 2).



Gambar 2.3. Struktur vektor pGEM[®]-T *easy*
[Sumber: Promega 2008: 4]

2.5. Sel Kompeten *E.coli* DH5 α

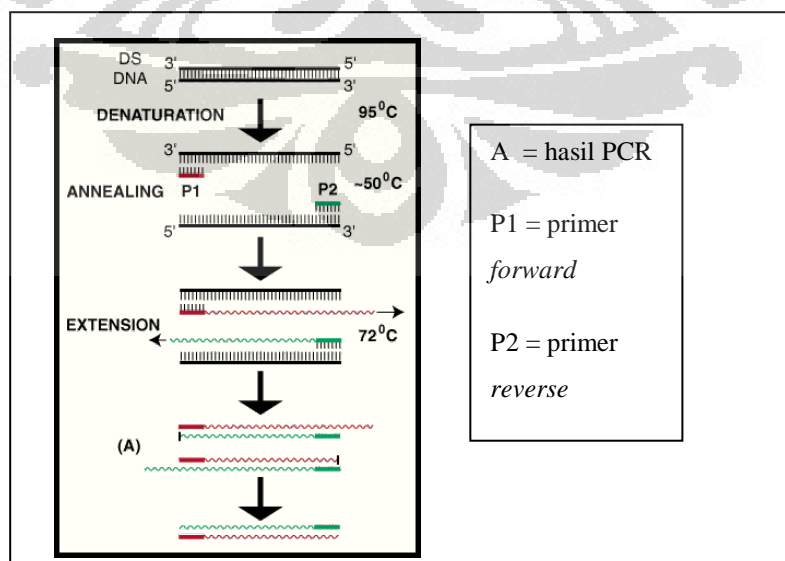
Sel kompeten merupakan suatu sel bakteri yang telah diberi perlakuan dengan senyawa garam seperti CaCl₂, sehingga sel tersebut mampu untuk menerima DNA asing (Wong 1997: 125). Sel bakteri yang umumnya dijadikan sebagai sel kompeten adalah sel bakteri *Escherichia coli*. Sel *E. coli* yang dijadikan sebagai sel kompeten terdiri atas beberapa *strain*, antara lain sel *E. coli* BB4, BL21, DH1, DH5 α , JM105, dan lain-lain. Sel *E. coli* dapat dijadikan sebagai sel inang yang baik karena memiliki beberapa karakteristik yang menguntungkan proses pengklonaan, antara lain adalah memungkinkan adanya

proses penapisan biru putih, tidak memiliki aktivitas endonuklease tipe I, serta mampu mencegah pembelahan klonal. Sel *E. coli* DH5 α merupakan sel *E. coli* yang mengalami mutasi pada gen *recA1*, sehingga menyebabkan sel tersebut mampu memperbanyak DNA asing yang dibawa oleh vektor dan meningkatkan nilai efisiensi transformasi (Sambrook & Russell 2001: A3.7).

2.6. Teknik Molekular

2.6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik yang berfungsi untuk amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA merupakan hasil manipulasi kerja enzim DNA polimerase pada proses replikasi DNA. Replikasi DNA bertujuan untuk mengetahui bagaimana materi genetik diperbanyak, diperbaiki, ataupun diwariskan ke generasi berikutnya. DNA dapat diamplifikasi pada keadaan untai tunggal atau *single stranded* DNA (ssDNA). Oleh karena itu, ikatan DNA sampel yang akan diamplifikasi harus dilepaskan agar menjadi untai tunggal. Hal tersebut dilakukan dengan menaikkan suhu pada proses PCR. Peningkatan suhu mengakibatkan untai ganda DNA akan terlepas menjadi untai tunggal (Davis *dkk.* 1994: 114).



Gambar 2.4. Siklus PCR

[Sumber: Cowrie Genetic Database Project 2010: 1, telah diolah kembali.]

Proses PCR secara umum terbagi atas tiga tahap, yaitu tahap denaturasi, *annealing*, dan elongasi. Tahap denaturasi merupakan tahap saat untai ganda DNA dilepaskan menjadi untai tunggal. Suhu denaturasi umumnya berkisar antara 92°C sampai 94°C. Suhu denaturasi yang terlalu rendah dapat mengakibatkan untai ganda DNA gagal berpisah, sehingga proses amplifikasi tidak akan terjadi. Waktu denaturasi juga sangat memengaruhi proses PCR. Waktu denaturasi yang terlalu lama akan mengurangi efektifitas dari enzim polimerase (Russell 1994: 304--306). Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer pada sampel DNA yang akan diamplifikasi. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat mengakibatkan primer tidak menempel spesifik pada sampel DNA, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan primer tidak mampu menempel pada sampel DNA. Gagalnya primer menempel pada sampel DNA mengakibatkan proses amplifikasi tidak dapat terjadi. Waktu *annealing* juga memengaruhi keberhasilan proses amplifikasi. Waktu *annealing* yang terlalu singkat dapat mengakibatkan primer tidak mampu menempel, sedangkan waktu *annealing* yang terlalu lama mengakibatkan primer akan gagal menempel akibat ikatan yang kurang stabil. Tahap elongasi merupakan tahap pemanjangan komplement sampel DNA. Proses tersebut dibantu oleh enzim *Taq DNA polimerase*. Basa komplement pada proses elongasi tersusun atas dNTP yang terdapat pada *PCR Mixture*. *Taq DNA polimerase* mengkatalis pemanjangan komplement sampel DNA dengan kecepatan 35 sampai 70 basa per detik. Sampel DNA yang terlalu panjang membutuhkan waktu elongasi yang lebih lama untuk menyelesaikan proses elongasi sempurna (McPherson *dkk.* 1995: 13--14).

2.6.2 Elektroforesis

Elektroforesis adalah proses pemisahan molekul-molekul bermuatan dalam medan listrik (Lawrence 1989: 156). Prinsip kerja elektroforesis adalah pemisahan molekul DNA, RNA, atau protein berdasarkan kecepatan migrasi tiap-tiap molekul dalam sebuah medan listrik (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Molekul DNA seperti protein dan senyawa biologis lainnya membawa muatan listrik. Molekul DNA memiliki muatan negatif (Martin 1996: 50).

Elektroforesis gel digunakan untuk memisahkan protein dan asam nukleat. Medium yang digunakan dalam teknik elektroforesis berupa larutan *buffer* dan gel. Gel adalah suatu jaring-jaring kompleks molekul polimer. Gel yang digunakan terdiri atas poliakrilamida dan agarosa (Old & Primrose 1985: 7; Martin 1996: 3). Gel poliakrilamida pada umumnya digunakan untuk memisahkan molekul organik yang memiliki ukuran sedang hingga berukuran kecil, karena gel poliakrilamida memiliki pori-pori yang kecil. Gel poliakrilamida memiliki daya pisah yang besar, sehingga lebih akurat dalam proses pemisahan molekul organik. Kekurangan gel poliakrilamida antara lain sulit untuk disisipkan dan kurang aman karena menggunakan zat karsinogenik yang dapat menimbulkan kanker apabila digunakan dalam jumlah dan konsentrasi yang banyak (Old & Primrose 1985: 5; Leonard *dkk.* 1994: 149).

Gel agarosa dibuat dari bahan alami yaitu dari ekstrak rumput laut. Gel agarosa memiliki pori-pori yang besar, sehingga dapat digunakan untuk memisahkan molekul organik yang berukuran relatif besar. Kekurangan penggunaan gel agarosa antara lain kurangnya keakuratan dalam proses pemisahan karena daya pisahnya kecil. Kelebihan penggunaan gel agarosa adalah mudah untuk disisipkan dan lebih aman karena terbuat dari bahan alami yang tidak bersifat karsinogenik (Davis *dkk.* 1994: 151).

2.6.3 Ligasi

Ligasi merupakan proses penggabungan dua fragmen DNA. Proses ligasi dikatalis oleh enzim ligase. Enzim ligase merupakan enzim yang mengkatalis reaksi pembentukan ikatan fosfodiester antar potongan fragmen DNA dengan menggunakan *bacteriophage T4 DNA ligase*. Ujung-ujung potongan *blunt end* juga dapat disatukan dengan enzim tersebut, akan tetapi efisiensi dari proses tersebut relatif rendah (Wong 1997: 70--71).

2.6.4 Transformasi gen

Transformasi merupakan proses introduksi plasmid ke dalam sel inang atau sel kompeten. Proses transformasi diawali dengan membuat sel kompeten. Sel kompeten merupakan sel bakteri yang telah diberikan perlakuan CaCl_2 atau kombinasi garam lainnya. Metode transformasi terdiri atas metode CaCl_2 , elektroporasi, transfer dengan *Agrobacterium tumefaciens*, mikroinjeksi, biolistik atau *particle bombardment*, dan transfer dengan PEG (poliethylen glikol). Metode yang digunakan bergantung pada tipe sel yang digunakan. Penggunaan larutan CaCl_2 pada metode CaCl_2 yang dipicu kejutan panas (*heat shock*) dapat menyebabkan DNA menempel pada membran luar sel kompeten. DNA dapat masuk ke dalam sel kompeten setelah diberi kejutan panas (Wong 1997: 133).

2.6.5 Pengklonaan

Pengklonaan merupakan proses pembuatan salinan dari suatu gen dengan prinsip teknologi DNA rekombinan (Brooker 2005: 490). Molekul DNA rekombinan dibuat dengan menyisipkan fragmen DNA yang mengandung gen target ke dalam vektor. Vektor berperan sebagai pembawa gen yang akan diklona ke dalam sel inang. Vektor yang ditransformasikan ke dalam sel inang akan ikut membelah setiap sel melakukan pembelahan, sehingga salinan identik gen target akan tersalin dengan jumlah yang banyak (Wong 1997: 4). Vektor dalam proses pengklonaan umumnya memiliki beberapa elemen struktural, antara lain penanda awal replikasi, sekuen pengenalan untuk enzim restriksi, penanda seleksi (umumnya berupa gen resistensi antibiotik), dan daerah promoter yang memungkinkan berjalannya proses transkripsi DNA yang disisipkan. Vektor yang umumnya digunakan dalam proses pengklonaan antara lain adalah plasmid, fagemid, *bacterial artificial chromosome* (BAC), dan *yeast artificial chromosome* (YAC) (Wong 1997: 98; Snustads & Simmons 2003: 486).

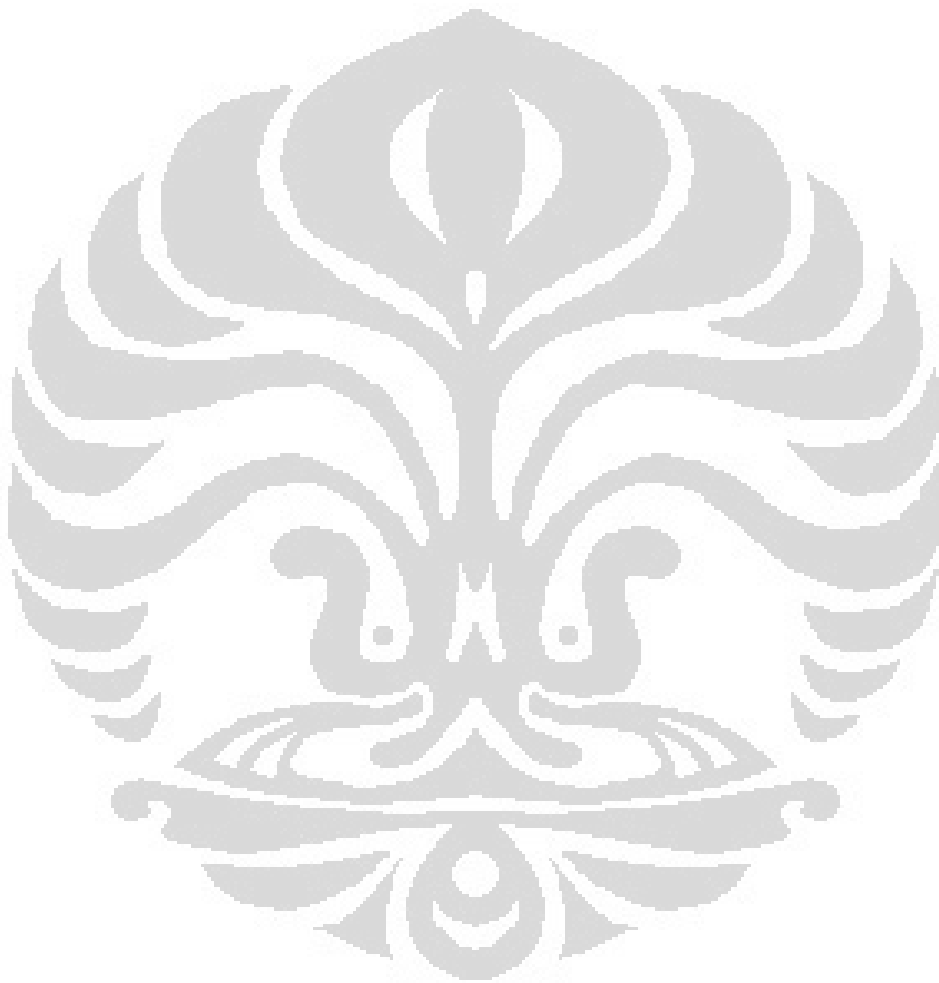
2.6.6 Seleksi vektor rekombinan hasil pengklonaan

Seleksi vektor rekombinan dapat dilakukan dengan beberapa metode. Metode seleksi tersebut antara lain dengan menguji sensitivitas dan resistensi terhadap antibiotik, menumbuhkan sel transforman pada medium selektif nutrisi, seleksi biru putih, analisis restriksi DNA plasmid, dan hibridisasi asam nukleat (Sambrook *dkk.* 1989: 1.6). Seleksi biru putih atau teknik α -komplementasi terjadi ketika dua fragmen inaktif enzim β -galaktosidase bersatu membentuk enzim fungsional. Enzim β -galaktosidase menghidrolisis laktosa menjadi glukosa. Aktivitas enzim tersebut dapat diuji dengan menggunakan senyawa X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosidase) yang menghasilkan warna biru pada medium. Enzim tersebut dihasilkan oleh gen *lacZ* pada daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) vektor pengklonaan. Senyawa isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG) juga digunakan sebagai induser untuk menonaktifkan represor *lacZ*. Bakteri yang mengandung plasmid rekombinan tidak dapat menghasilkan enzim β -galaktosidase, sehingga pada medium akan berwarna putih. Bakteri yang tidak mengandung plasmid rekombinan tetap akan menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dapat memecah senyawa X-gal, sehingga koloni akan berwarna biru (Sambrook & Russell 2001: 1.149--1.150).

2.6.7 Sekuensing

Sekuensing merupakan proses penentuan urutan basa nukleotida suatu molekul dari suatu materi genetik seperti fragmen DNA atau RNA (Russell 1990: 304). Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert merupakan metode sekuensing yang menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai fragmen DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer dari fragmen DNA target (Sambrook *dkk.* 1989: 13.7 & 3.11). Sebagian besar proses sekuensing telah dimodifikasi menjadi suatu program pada komputer, sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Proses tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger.

Komputerisasi program sekuensing umumnya menggunakan beberapa macam pewarna yang dapat berpendar untuk memberikan label pada ddNTP. Pewarna tersebut menggantikan peran dari radioaktif fosfat. Pembacaan sekuen dilakukan oleh sistem komputer dengan membedakan panjang gelombang yang berbeda dari hasil pendaran beberapa jenis pewarna (Paoella 1998: 193).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian (TPP), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek), Serpong. Penelitian berlangsung selama 11 bulan, terhitung sejak Januari 2011 hingga November 2011.

3.2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah mikropipet 0,1--2,5 μ l [Dragon-Med], mikropipet 2--20 μ l [Dragon-Med], mikropipet 20--200 μ l [Dragon-Med], mikropipet 100--1000 μ l [Dragon-Med], mesin vorteks [Heidolph REAX 2000], inkubator [Mettler], mesin sentrifugasi [Hettich Zentrifugen-Micro 2000R], freezer -20°C [LG Expresscool], desikator [Vitlab], mesin PCR [ESCO Swift-maxi], timbangan digital [Kern-ew], *microwave oven* [Panasonic], aparatus elektroforesis [Mupid Ex-U], UV-Transilluminator, Hoefer's Photo Man, kamera digital [Canon Power Shot S5IS], komputer, *hot plate with magnetic stirrer* [Cimarec-2], magnetic stirrer, autoklaf sterilisasi [ALP KT-40], autoklaf destruksi [Hirayama HVE-50], freezer 4°C [Sanyo SMR-120F], *Laminar Flow Cabinet* [ESCO], inkubator *shaker* [YihDer LM-450D], freezer -41°C [Haier], inkubator *water bath* [Pharmacia IKB-MultiTemp II], mesin *nano drop spectrophotometer* [ND-1000], mesin sekuensing [Applied Biosystem Hitachi-Genetic Analyzer 3130], erlenmeyer 250 ml [Iwaki PYREX[®]], gelas beaker 250 ml [Iwaki PYREX[®]], gelas ukur 100 ml, cawan petri, pembakar bunsen, alas timbang, sendok timbang, rak *PCR tube*, pisau *scapel*, *ice box*, dan gunting.

3.3 Bahan

3.3.1 Objek penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang berumur 4--6 bulan, dengan panjang rata-rata 30 cm, serta berat rata-rata 350 g. Ikan nila didapatkan dari kolam pemeliharaan laboratorium *outdoor* Laptiab BPPT, kolam budidaya ikan nila salin Karawang, dan Keramba Jaring Apung (KJA) Waduk Cirata. Sirip kaudal ikan nila tersebut nantinya akan digunakan untuk proses isolasi DNA. Ikan nila yang digunakan dalam penelitian adalah ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, dan JICA. Terdapat 2 sirip awetan ikan nila yang digunakan pada penelitian. Sumber ikan nila yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.3.1.

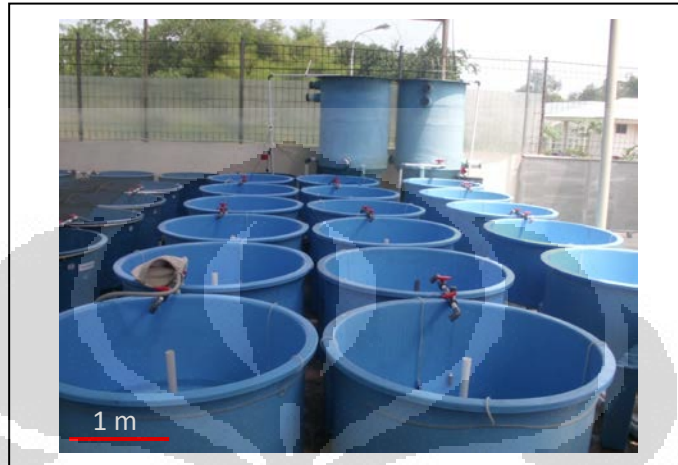
Tabel 3.3.1. Sumber ikan nila yang digunakan dalam penelitian

No.	Ikan Nila	Sumber
1.	<i>Strain</i> GESIT	Laboratorium <i>outdoor</i> Laptiab
2.	<i>Strain</i> Red Nifi	Laboratorium <i>outdoor</i> Laptiab
3.	<i>Strain</i> Selfam	Karawang
4.	<i>Strain</i> BEST	Laboratorium <i>outdoor</i> Laptiab
5.	<i>Strain</i> Chitra Lada	Karawang
6.	<i>Strain</i> Umbulan	Karawang
7.	<i>Strain</i> Putih	Karawang
8.	<i>Strain</i> Nirwana	Waduk Cirata
9.	<i>Strain</i> GIFT (sirip kaudal awetan)	Ternate
10.	<i>Strain</i> JICA(sirip kaudal awetan)	Jambi

3.3.2. Pemeliharaan

Ikan nila yang digunakan selama penelitian dipelihara dalam bak fiber berdiameter 1 meter, yang dibedakan antara induk jantan dan betina (Gambar

3.3.2.). Pemeliharaan dilakukan di laboratorium *outdoor*, Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian, BPPT, Puspiptek, Serpong. Ikan nila diberi pakan komersil berupa butiran [CPP 781] sebanyak 3--4% dari berat badan ikan. Pemberian pakan dilakukan 2 kali sehari, yaitu pagi hari dan sore hari.

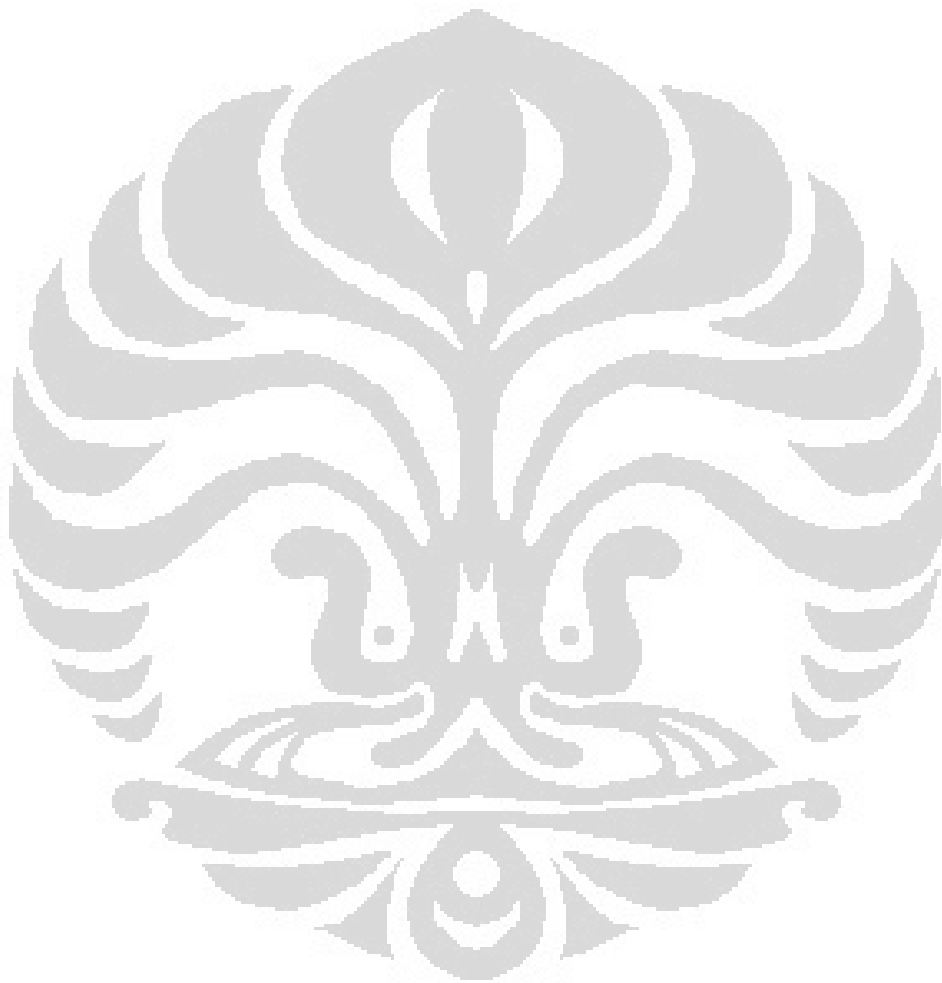


Gambar 3.3.2. Bak tempat pemeliharaan ikan nila
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

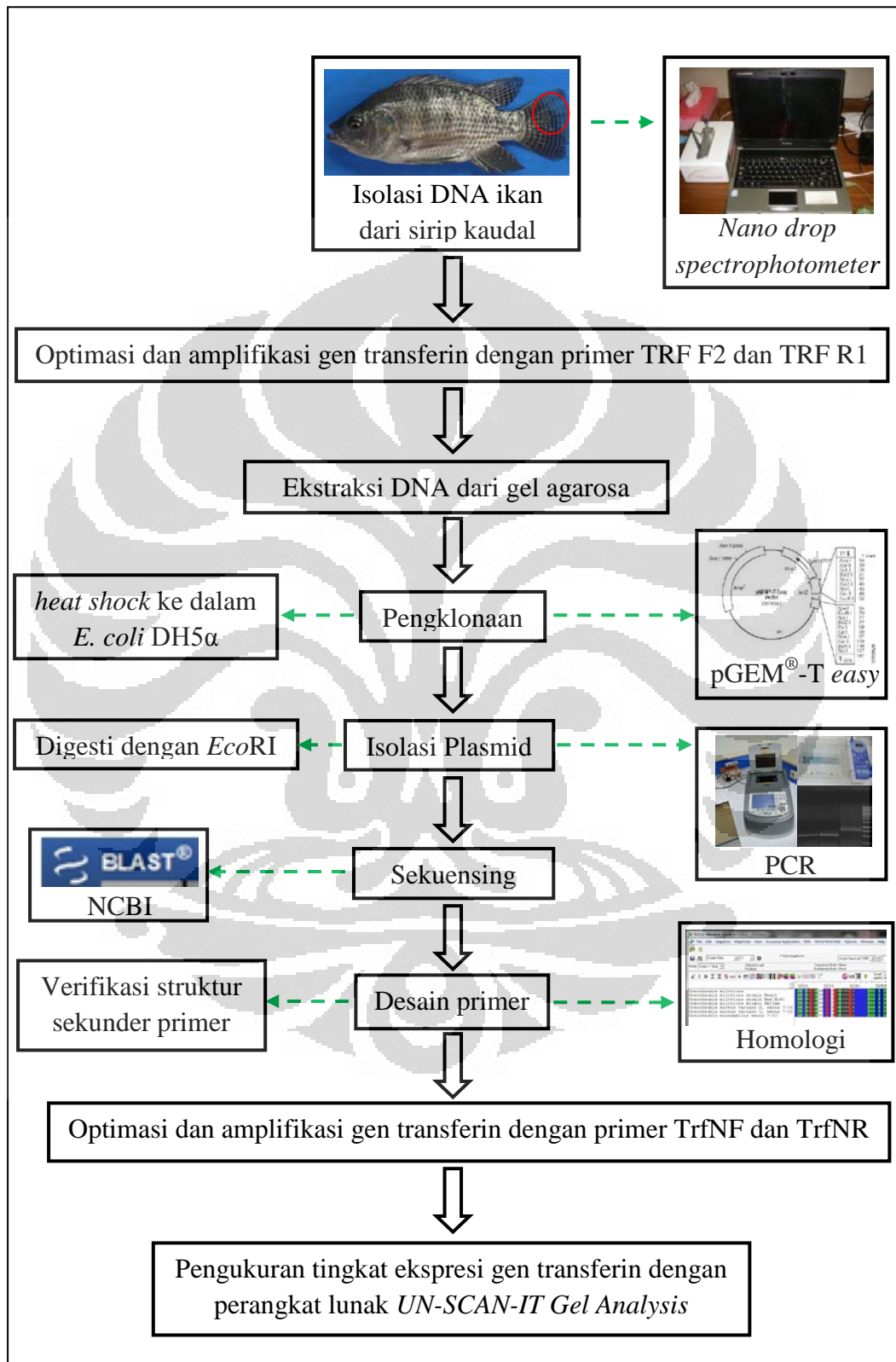
3.3.3 Bahan habis pakai

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah TNES-Urea *buffer* (Wasko *dkk.* 2003: 161--162), fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1), proteinase-k [Fermentas], sodium asetat 3M, etanol absolut [Merck], TE *buffer*, RNase [Fermentas], primer TRF F2 (TTGACAACCTATRAMRCCTGCTYCC) [1st Base], primer TRF R1 (CAGCSGTAAACACCTGACCT) [1st Base], dNTP 2 mM [Fermentas], 10x Dream taq *buffer* [Fermentas], Dream taq [Fermentas], bubuk agarosa [Fermentas], 1x TBE [Fermentas], 6x loading dye [Fermentas], marka DNA 1 kb [Fermentas], marka DNA 50 pb [Fermentas], ethidium bromida [Merck], vektor pGEM[®]-T *easy* [Promega], 2x *ligation buffer* [Promega], T4 DNA Ligase [Promega], *tryptone* [Bio Basic Inc.], *yeast extract* [Bio Basic Inc.], NaCl [Merck], KCl 250 mM, KOH 1M, bubuk agar [BiomarkTM Laboratories], ampicillin, IPTG, X-Gal, koloni *E. Coli* DH5 α , CaCl₂: MgCl₂ (20 mM:80 mM), CaCl₂ 0,1 M, tips 0,1--2,5 μ l, tips 2--200 μ l, tips 100--1000 μ l, *microcentrifuge tube* 1,5 ml, *micro thin wall* 1,2 ml (PCR *tube*), aluminium foil, parafilm,

pHmeter [LaMonde], selotip, tisu, *disposable gloves* [Sensi], *plastic wrap*, spidol marker, tusuk gigi, dan es batu.



3.4 Skema Kerja Penelitian



Gambar 3.4 Skema alur kerja penelitian

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan larutan/*buffer*

Pembuatan larutan/*buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.5.2 Pembuatan medium

Pembuatan medium dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.5.3 Ekstraksi DNA genom ikan nila

Ekstraksi DNA dilakukan pada ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, JICA, ikan mujair, ikan mas, ikan patin, dan ikan gurami yang didapatkan dari berbagai tempat budidaya (Tabel 3.3.1.). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan sirip kaudal ikan sebagai sampel. Sirip kaudal dipotong sepanjang kurang lebih 3 cm, dengan berat sekitar 0,3 g. Metode fenol kloroform digunakan untuk melakukan ekstraksi DNA. Sirip kaudal yang sudah dipotong dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml, kemudian ditambahkan 700 μ l TNES-Urea lysis *buffer* dan 5 μ l *proteinase-K*. Sampel dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung beberapa kali, kemudian diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 12--18 jam. Sampel ditambahkan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1) sebanyak 700 μ l setelah diinkubasi. Sampel dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru. Langkah tersebut diulangi sampai 3 kali untuk memastikan kemurnian DNA.

Supernatan yang terbentuk kemudian ditambahkan dengan kloroform : isoamil alkohol (24:1) sebanyak 700 μ l. Sampel dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung selama 10 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang

terbentuk dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru. Langkah tersebut diulangi sampai 3 kali untuk memastikan kemurnian DNA.

Supernatan yang terbentuk ditambahkan sodium asetat 3M sebanyak 20 μ l dan etanol absolut dingin sebanyak 60 μ l. Sampel kemudian diinkubasi di dalam freezer -20°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C setelah diinkubasi. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet ditambahkan 1 ml etanol 70% dingin, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet divakum selama kurang lebih 30 menit untuk menghilangkan sisa etanol dan memastikan bahwa pelet benar-benar kering. Pelet DNA yang terbentuk kemudian ditambahkan 20 μ l *TE buffer* dan 1 μ l RNase. Sampel DNA genom kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam agar enzim RNase dapat bekerja secara optimal. Sampel kemudian siap digunakan dan dapat disimpan dalam freezer -20°C .

3.5.4 Perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan mesin *Nano Drop Spectrophotometer* [ND-1000].

3.5.5 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel cDNA ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi, serta sampel DNA genom dari ikan nila *strain* Selfam diamplifikasi untuk mendapatkan sekuen basa yang spesifik. Proses PCR tersebut menggunakan yang telah dikonstruksi oleh Nugroho (data belum dipublikasikan), yaitu primer *forward* TRF F2 (TTGACAACTATRAMRCCTGCTYCC) dan primer *reverse* TRF R1 (CAGCSGTAAACACCTGACCT). Kedua primer tersebut akan mengamplifikasi 800 pb pada sampel DNA dan 515 pb pada sampel cDNA. Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada Lampiran 4.

Program yang digunakan pada proses PCR terdiri atas 2 proses, yaitu proses optimasi dan amplifikasi. Proses optimasi dibuat dengan menggunakan

teknik gradien PCR. Teknik gradien PCR memungkinkan terjadinya beberapa suhu *annealing* dalam 1 proses PCR. Program optimasi PCR dapat dilihat pada Lampiran 8.

Program yang digunakan untuk amplifikasi didapatkan setelah proses optimasi selesai dilakukan. Program PCR untuk proses amplifikasi menggunakan suhu *annealing* optimal yang sudah didapatkan dari hasil optimasi, yaitu 59°C. Program PCR dapat dilihat pada Lampiran 9.

3.5.6 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan adalah 0,8% dan 2,5%. Gel agarosa 0,8 % dibuat dengan cara melarutkan 0,32 g bubuk agarosa ke dalam 40 ml TBE 1x, sedangkan gel agarosa 2,5 % dibuat dengan cara melarutkan 1 g bubuk agarosa ke dalam 40 ml TBE 1x. Campuran kemudian dipanaskan dengan menggunakan *microwave oven* sampai bubuk agarosa larut sempurna. Larutan gel agarosa kemudian dicetak pada cetakan aparatus elektroforesis. Gel agarosa yang sudah membeku dipindahkan ke dalam *running buffer* elektroforesis. Produk PCR dicampur dengan 6x *loading dye* (2:1), lalu dimasukkan ke dalam sumur sampel. Marka DNA 1 kb atau 50 pb dimasukkan setelah semua sampel sudah dimasukkan ke dalam sumur sampel. Perbandingan antara marka DNA, 6x *loading dye*, dan akuades adalah satu banding satu banding dua (1:1:2). Aparatus elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel agarosa kemudian direndam di dalam larutan ethidium bromida selama kurang lebih 15 menit. Pita-pita DNA yang terbentuk pada gel dilihat dengan UV-Transilluminator, lalu didokumentasikan untuk dianalisis.

3.5.7 Ekstraksi DNA dari fragmen gel agarosa

Proses ekstraksi DNA dari fragmen gel agarosa dilakukan dengan menggunakan kit "*Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*" dari Geneaid. Proses ekstraksi diawali dengan memotong bagian gel yang memiliki pita spesifik

DNA yang diinginkan. Potongan gel kemudian dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml dan ditambahkan larutan *DF Buffer* sebanyak 500 μ l. Sampel kemudian dihomogenisasikan dengan vorteks, lalu diinkubasi pada suhu 55°C sampai 60°C pada inkubator *water bath* selama 10--15 menit. Sampel dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung setiap 2--3 menit sekali. Sampel diinkubasi hingga potongan gel larut sempurna dengan pelarut. Sampel yang telah diinkubasi didiamkan sampai sampel mencapai suhu ruang. Sampel sebanyak 800 μ l dipindahkan ke dalam *DF Column* yang sudah dimasukkan ke dalam tabung pengumpul 2 ml. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 4°C. Supernatan yang tertampung pada tabung pengumpul dibuang. Proses sentrifugasi diulangi jika sampel lebih dari 800 μ l. Sampel pada *DF Column* yang sudah disentrifugasi ditambahkan *WI Buffer* sebanyak 400 μ l. Campuran kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 4°C. Supernatan yang tertampung pada tabung pengumpul dibuang. Sampel pada *DF Column* yang sudah disentrifugasi kemudian ditambahkan dengan *Wash Buffer* sebanyak 600 μ l. Sampel tersebut didiamkan kurang lebih selama 1 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik pada suhu 4°C. Supernatan yang tertampung pada tabung pengumpul dibuang. Sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4°C untuk mengeringkan matriks pada *DF Column*, kemudian dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml. *Elution Buffer* sebanyak 15--50 μ l ditambahkan ke dalam *DF Column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang tertampung pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml merupakan sampel DNA hasil ekstraksi DNA dari fragmen gel agarosa dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C.

3.5.8 Ligasi

Ligasi dilakukan dengan menggunakan plasmid pGEM[®]-T *easy* [Promega]. Campuran dalam proses ligasi dapat dilihat pada Lampiran 7. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 12--18 jam.

3.5.9 Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α

Sel kompeten dibuat berdasarkan metode Hanahan (Sambrook & Russell 2001: 1.105--1.109). Bakteri yang digunakan adalah *E. coli strain* DH5 α . Sebanyak satu ose koloni dari cawan petri biakan dimasukkan ke dalam 50 ml medium SOC cair, kemudian diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu 37°C selama 12--18 jam. Sebanyak 5 ml volume kultur dimasukkan ke dalam 45 ml medium SOC cair yang baru, kemudian diinkubasi kembali pada inkubator *shaker* pada suhu 37°C selama 3 jam. Kultur dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml, kemudian diinkubasi dalam es selama 10 menit. Kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet yang terbentuk ditambahkan CaCl₂: MgCl₂ (20 mM:80 mM) sebanyak 750 μ l. Campuran diinkubasi di dalam es selama 20 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang, sedangkan pelet ditambahkan CaCl₂ 0,1 M sebanyak 100 μ l. Sel kompeten disimpan dalam freezer -41°C dan siap untuk digunakan.

3.5.10 Transformasi

Proses transformasi dilakukan dengan metode *heat shock* (Sambrook & Russell 2001: 1.105--1.109). Sel kompeten dicampur dengan plasmid (20 : 1). Campuran diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Campuran kemudian dimasukkan ke dalam inkubator *water bath* dengan suhu 42°C selama 35 detik, kemudian diinkubasi di dalam es selama 2 menit. Campuran kemudian ditambahkan medium SOC cair sebanyak 900 μ l dan diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu 37°C selama 45 menit. Sebanyak 100--200 μ l campuran dituang ke dalam medium seleksi biru putih, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 12--18 jam.

3.5.11 Isolasi plasmid

Isolasi plasmid dari hasil pengklonaan dilakukan menggunakan metode *Alkaline Lysis with SDS minipreparation* (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34). Bakteri hasil pengklonaan yang positif (berwarna putih) ditumbuhkan pada medium SOB cair yang mengandung ampisilin 100 µg/ml. Proses penumbuhan dilakukan selama 12--18 jam pada suhu 37° C. Bakteri yang telah ditumbuhkan kemudian dipindahkan sebanyak 1 ml ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml. Sentrifugasi kemudian dilakukan dengan kecepatan 6.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disuspensikan dengan *alkaline lysis solution I* dingin sebanyak 100 µl, lalu dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung dan didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit. *Alkaline lysis solution II* sebanyak 200 µl kemudian ditambahkan pada suspensi pelet dan dihomogenisasikan dengan cara membolak-balik tabung beberapa kali. Campuran kemudian diinkubasi di dalam es selama 5 menit. *Alkaline lysis solution III* dingin sebanyak 150 µl kemudian ditambahkan pada suspensi setelah proses inkubasi selesai dilakukan. Tabung dihomogenisasikan dengan cara dibolak-balikan beberapa kali. Inkubasi kemudian dilakukan kembali di dalam es selama 5 menit. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru, kemudian ditambahkan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25:24:1) sebanyak 700 µl. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru dan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 700 µl. Tabung kemudian dihomogenisasikan dengan cara dibolak-balikan beberapa kali dan diinkubasi pada suhu -20° C selama 10 menit. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet yang diperoleh dicuci dengan etanol 70% sebanyak 1 ml. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama

10 menit pada suhu 4° C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet yang diperoleh dikeringkan menggunakan mesin vakum selama kurang lebih 30 menit dengan tutup tabung dibiarkan terbuka. Pelet ditambahkan dengan larutan *TE buffer* sebanyak 20--35 µl dan RNase sebanyak 1 µl, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

3.5.12 Digesti DNA

Proses digesti DNA dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific 2011: 1). Reaksi digesti DNA dibuat dengan mencampur seluruh komponen reaksi (*buffer*, enzim, *DNA template*, dan *nuclease-free water*) pada *microcentrifuge tube* 1,5 ml. Campuran reaksi digesti kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama satu setengah jam, lalu diinkubasi kembali pada suhu 65° C selama 5 menit. Komposisi reaksi digesti DNA dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.5.13 Sekuensing

Sekuensing dilakukan menggunakan alat dari Applied Biosystem Hitachi dengan seri Genetic Analyzer 3130. Pengerjaan sekuensing dilakukan oleh laboran Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT, Serpong.

3.5.14 Desain primer

Primer gen transferin dibuat dengan cara menyusun dan mengurutkan semua sekuen gen transferin ikan nila berbagai *strain* pada perangkat lunak *BioEdit Sequence Alignment Editor* versi 7.0.5.3. Sekuen gen transferin ikan nila dari berbagai *strain* didapatkan dari *gene bank* dan dari hasil analisis sekuensing. Sekuen gen transferin yang *conserved* kemudian dibuat primernya dengan menggunakan perangkat lunak *Primer 3* versi 0.4.0. Primer tersebut diuji untuk tidak membentuk struktur melingkar (*hairpin*), *self-dimer*, *cross dimer*, dan

palindrome. Pengujian tersebut dilakukan dengan bantuan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International*.

3.5.15 Optimasi PCR

Optimasi primer PCR perlu dilakukan kembali dengan menggunakan teknik gradien. Suhu *annealing* pada proses optimasi dibuat gradien dari 50°C sampai 60°C. Suhu *annealing* yang sudah optimal nantinya akan digunakan sebagai suhu *annealing* pada proses pengujian primer. Sampel yang digunakan pada tahap optimasi PCR adalah salah satu sampel DNA ikan nila.

3.5.16 Pengujian primer PCR

Suhu *annealing* optimal pada proses optimasi PCR digunakan sebagai suhu *annealing* pada proses pengujian primer. Primer hasil desain diuji dengan cara mencampurkan primer tersebut dengan PCR *mixture* pada proses PCR DNA genom ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, dan JICA. Kontrol negatif dalam proses tersebut digunakan ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*), ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan patin (*Pangasius hypothalmus*), dan ikan gurami (*Osprhronemus goramy*). Kontrol negatif yang digunakan merupakan sampel DNA ikan yang diharapkan tidak mampu menempel dengan primer yang dibuat.

3.5.17 Pengukuran tingkat ekspresi gen transferin

Tingkat ekspresi gen transferin pada ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, JICA, dan ikan mujair diukur dengan menggunakan perangkat lunak UN-SCAN-IT Gel Analysis. Prinsip kerja dari perangkat lunak tersebut adalah dengan membandingkan *pixel* semua sampel pada gel agarosa dengan marka DNA sebagai standar konsentrasi

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

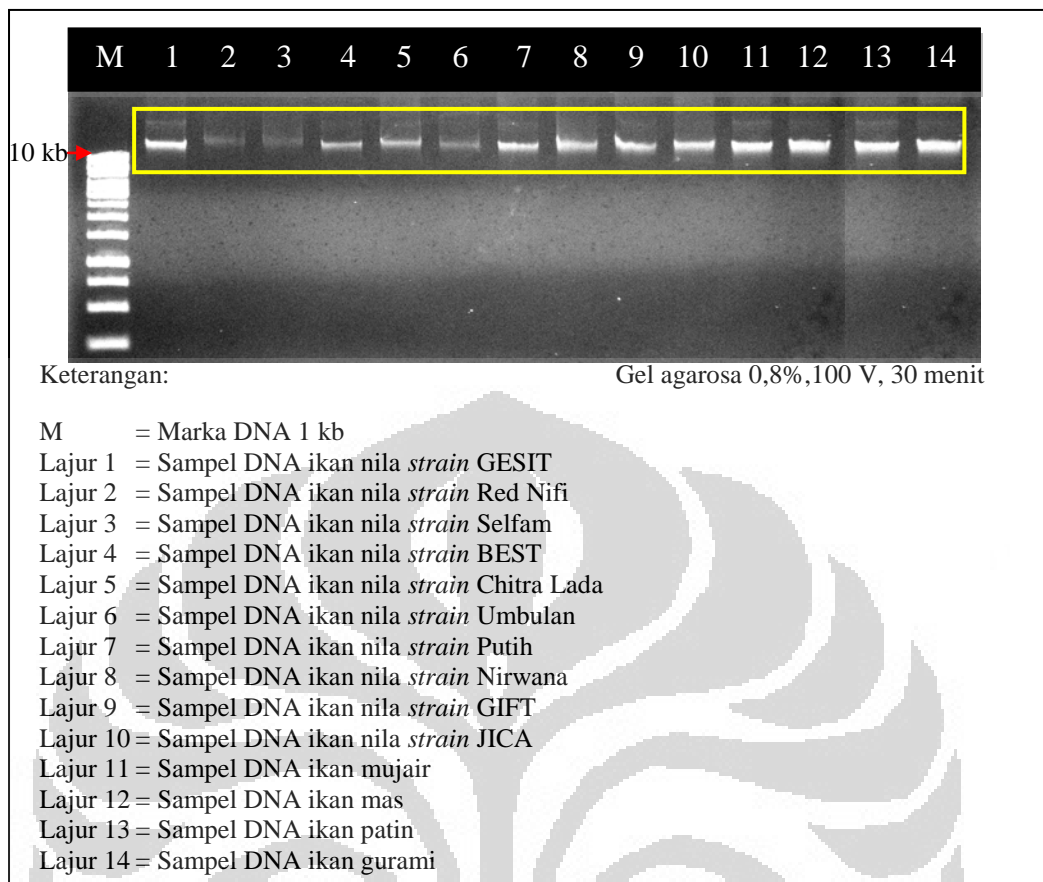
4.1.1 Isolasi DNA ikan

Hasil isolasi DNA ikan dapat diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan alat *nano drop spectrophotometer*. Hasil pengukuran hasil isolasi DNA ikan dapat dilihat pada Tabel 4.1.1.

Tabel 4.1.1. Hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA ikan

No.	Sampel Ikan	Kemurnian	Konsentrasi (ng/ μ L)
1	Nila <i>strain</i> GESIT	1,82	3.549
2	Nila <i>strain</i> Red Nifi	1,85	2.874
3	Nila <i>strain</i> Selfam	1,93	4.985
4	Nila <i>strain</i> BEST	1,88	3.475
5	Nila <i>strain</i> Chitra Lada	1,92	4.847
6	Nila <i>strain</i> Umbulan	1,85	2.948
7	Nila <i>strain</i> Putih	1,99	1.384
8	Nila <i>strain</i> Nirwana	1,98	4.214
9	Nila <i>strain</i> GIFT	1,93	2.384
10	Nila <i>strain</i> JICA	1,80	3.475
11	Mujair	1,96	1.833
12	Mas	1,97	1.493
13	Gurami	1,99	4.273
14	Patin	1,90	2.346

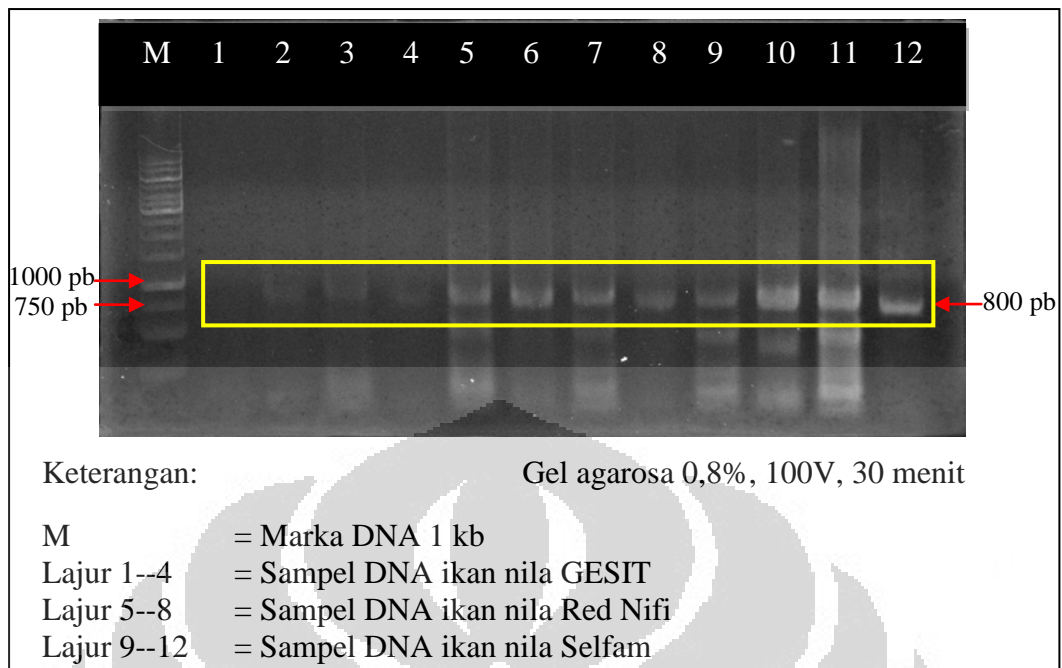
Hasil dari ekstraksi DNA tersebut divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Hasil visualisasi ekstraksi DNA ikan dapat dilihat pada Gambar 4.1.1.



Gambar 4.1.1. Hasil elektroforesis DNA ikan

4.1.2 Optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1

Sampel DNA yang digunakan pada proses optimasi PCR adalah sampel DNA ikan nila GESIT, Red Nifi dan Selfam. Ikan nila GESIT dan Red Nifi digunakan sebagai sampel proses optimasi PCR, karena ikan tersebut mempunyai nilai ekspresi gen transferin yang paling tinggi diantara *strain* ikan nila yang lain (Nugroho 2009: 41--42). Ikan nila Selfam digunakan sebagai kontrol positif pada proses optimasi PCR. Hal tersebut karena ikan nila Selfam merupakan salah satu *strain* ikan nila yang berasal dari hasil seleksi ikan nila unggul. Hasil optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1 dapat dilihat pada Gambar 4.1.2.



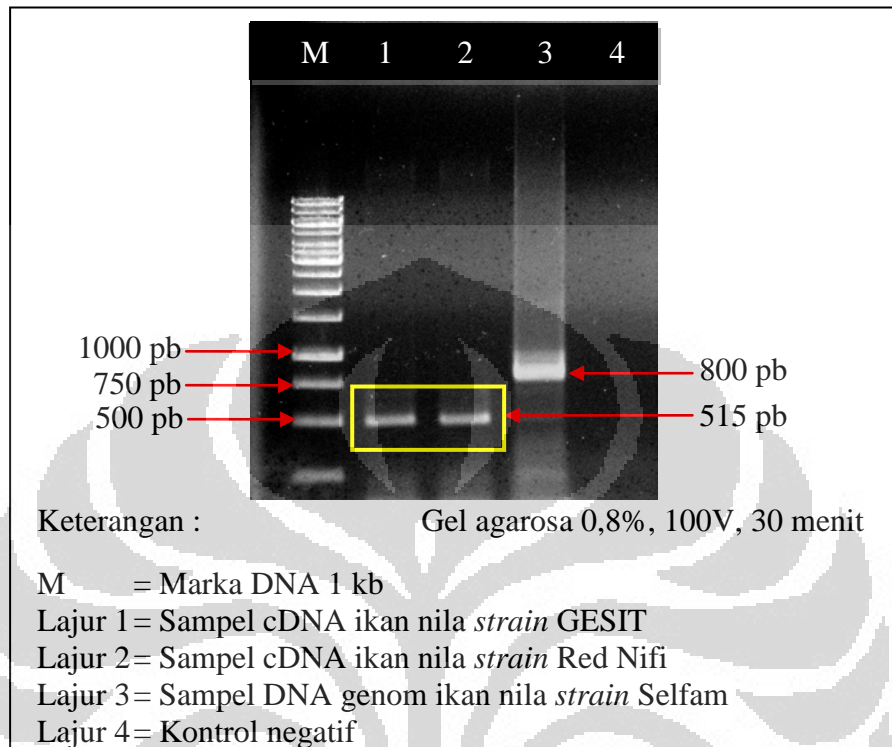
Gambar 4.1.2. Hasil optimasi PCR gen transferin ikan nila dengan menggunakan primer TRF F2 dan TRF R1

Gambar 4.2 menunjukkan sampel pada lajur 1, 5, dan 9 merupakan sampel dengan suhu *annealing* 56°C. Sampel pada lajur 2, 6, dan 10 merupakan sampel dengan suhu *annealing* 57°C. Sampel pada lajur 3, 7, dan 11 merupakan sampel dengan suhu *annealing* 58°C, sedangkan sampel pada lajur 4, 8, dan 12 merupakan sampel dengan suhu *annealing* 59°C. Gambar tersebut menunjukkan bahwa suhu *annealing* optimal untuk mengamplifikasi gen transferin ikan nila dengan menggunakan primer TRF F2 dan TRF R1 adalah 59°C. Hal tersebut dikarenakan sampel DNA pada suhu *annealing* 56°C, 57°C, dan 58°C menunjukkan adanya banyak pita DNA yang tidak spesifik, sedangkan sampel DNA pada suhu *annealing* 59°C menunjukkan pita tunggal yang spesifik (berukuran 800 pb).

4.1.3 Amplifikasi dan ekstraksi gel gen transferin dari cDNA ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi dan DNA genom ikan nila *strain* Selfam

Amplifikasi gen transferin dilakukan dengan menggunakan sampel cDNA ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi, serta sampel DNA genom ikan nila *strain* Selfam. Hasil amplifikasi gen transferin dari cDNA ikan nila *strain* GESIT, Red

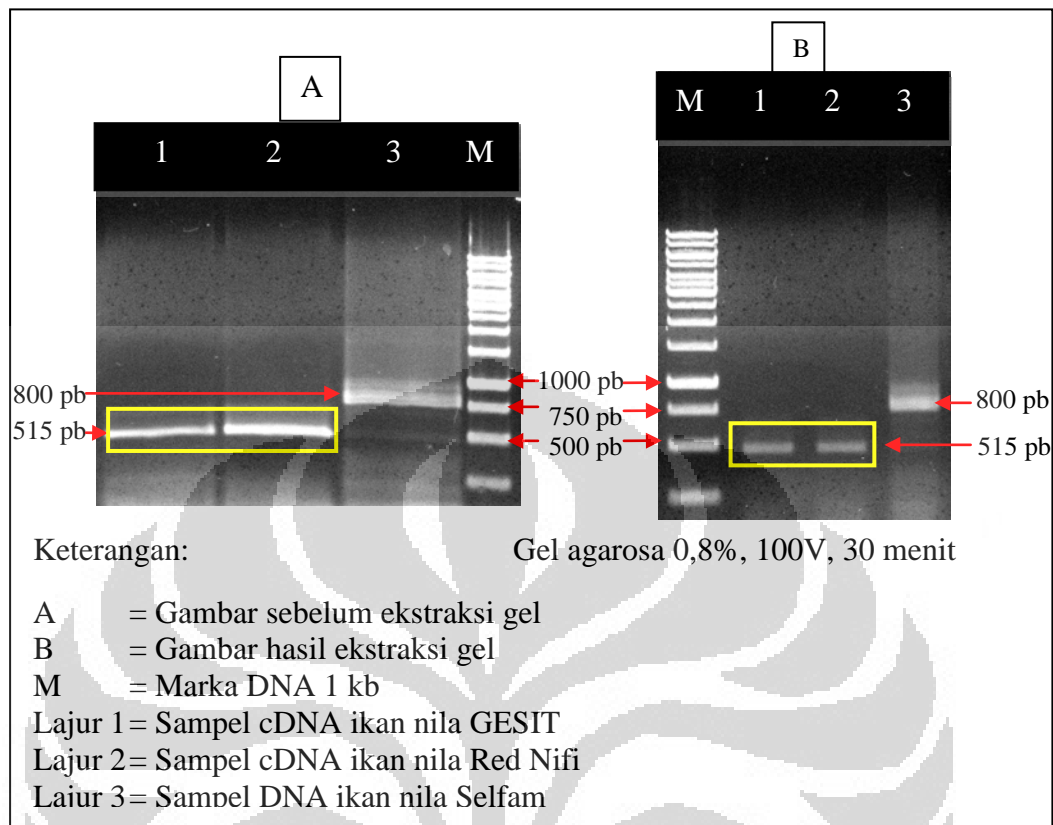
Nifi dan DNA genom ikan nila *strain* Selfam dengan metode PCR dapat dilihat pada Gambar 4.1.3.



Gambar 4.1.3. Hasil PCR gen transferin dari cDNA dan DNA genom ikan nila

Gambar 4.1.3. menunjukkan adanya 2 pita DNA dengan ukuran yang berbeda, yaitu 515 pb untuk sampel cDNA ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi serta 800 pb untuk sampel DNA genom ikan nila *strain* Selfam.

Gen transferin yang terdapat pada lajur 1, 2, dan 3 gel agarosa pada Gambar 4.1.3. selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*. Hasil ekstraksi gen transferin dari gel agarosa (Gambar 4.1.4. A) divisualisasi kembali dengan elektroforesis pada gel agarosa 0,8% (Gambar 4.1.4. B). Hasil visualisasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.4

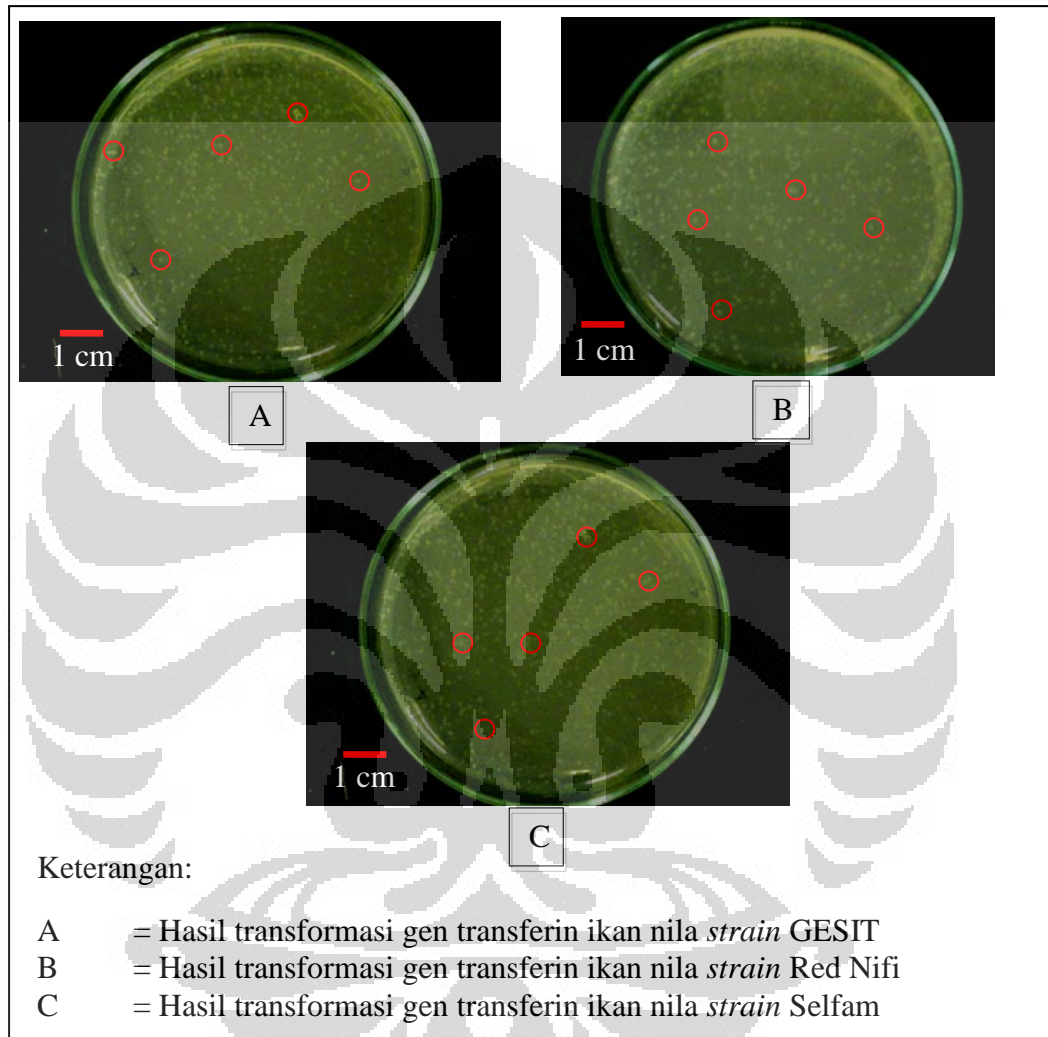


Gambar 4.1.4. Hasil elektroforesis gen transferin sebelum proses ekstraksi dari gel (A) dan sesudah proses ekstraksi dari gel (B)

Gambar 4.1.4. menunjukkan adanya pita DNA berukuran 515 pb untuk sampel cDNA ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi sebelum proses purifikasi (Gambar 4.1.4. A) dan setelah proses purifikasi (Gambar 4.1.4. B). Pita DNA berukuran 800 pb terdapat pada sampel DNA genom ikan nila *strain* Selfam sebelum proses purifikasi (Gambar 4.1.4. A) dan setelah proses purifikasi (Gambar 4.1.4. B)

4.1.4 Transformasi gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam

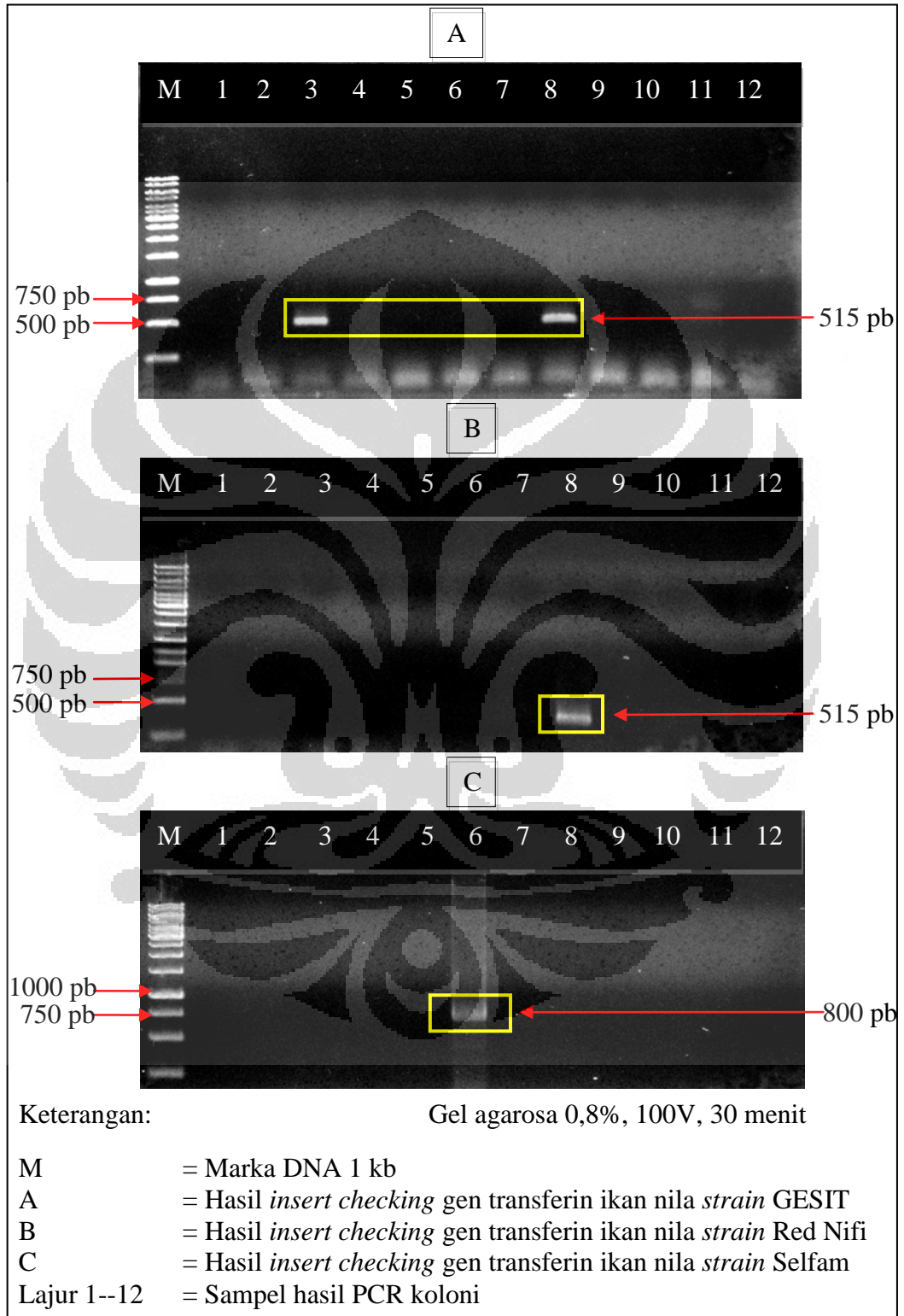
Hasil transformasi gen transferin yang diklona ke dalam *E.coli* DH5 α dapat dilihat pada Gambar 4.1.5



Gambar 4.1.5. Hasil transformasi gen transferin ikan nila

Dua belas koloni putih dari masing-masing sampel dipindahkan ke medium SOB padat yang baru dengan menggunakan tusuk gigi yang sudah disterilisasi dengan autoklaf. Medium tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 12--16 jam. Keberhasilan proses pengklonaan dikonfirmasi dengan menggunakan metode *direct PCR colony (insert checking)* dan elektroforesis. Primer yang digunakan untuk proses konfirmasi tersebut adalah primer

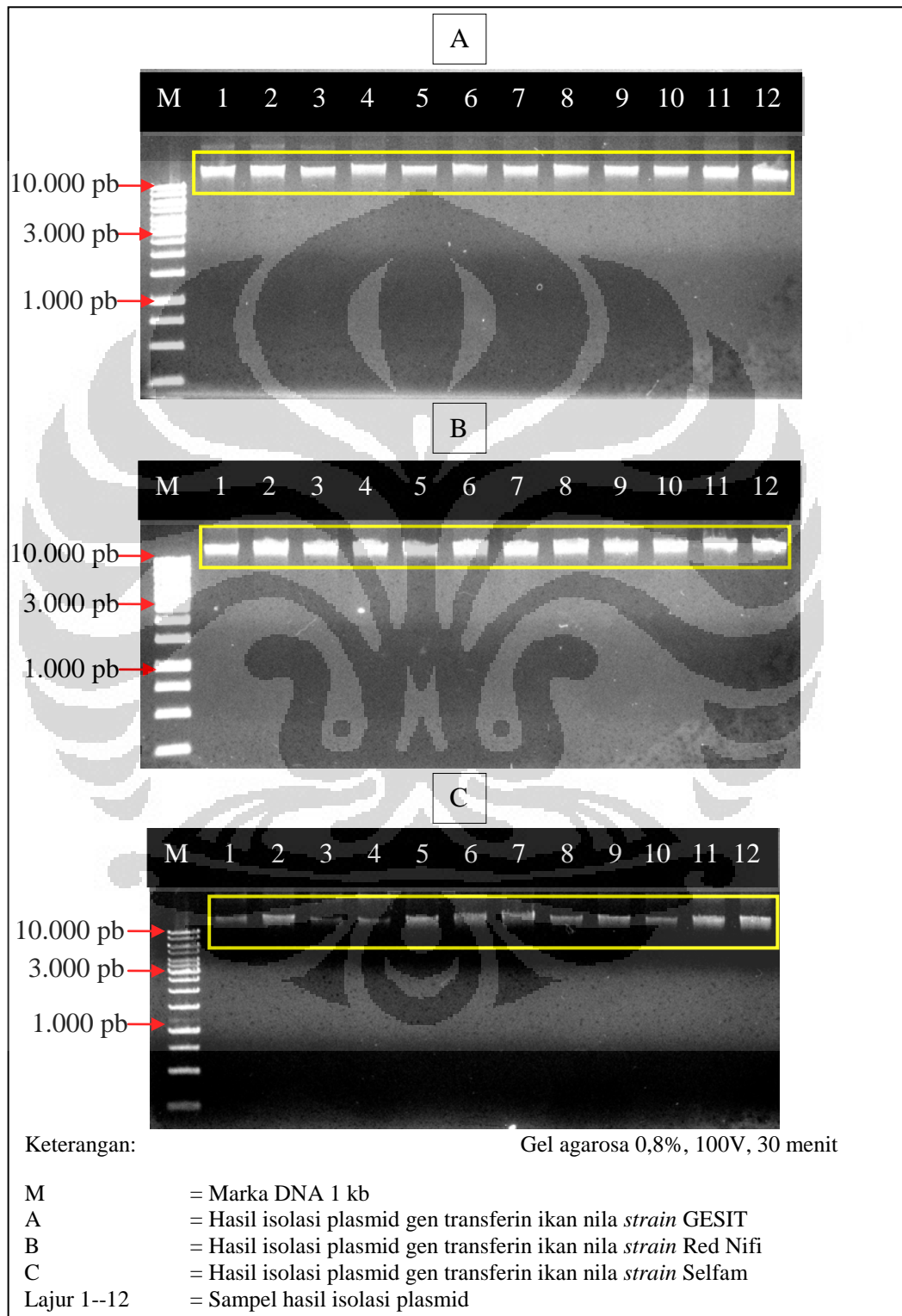
TRF F2 dan TRF R1. Hasil visualisasi proses hasil transformasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.6.



Gambar 4.1.6. Hasil visualisasi *insert checking* hasil transformasi gen transferin

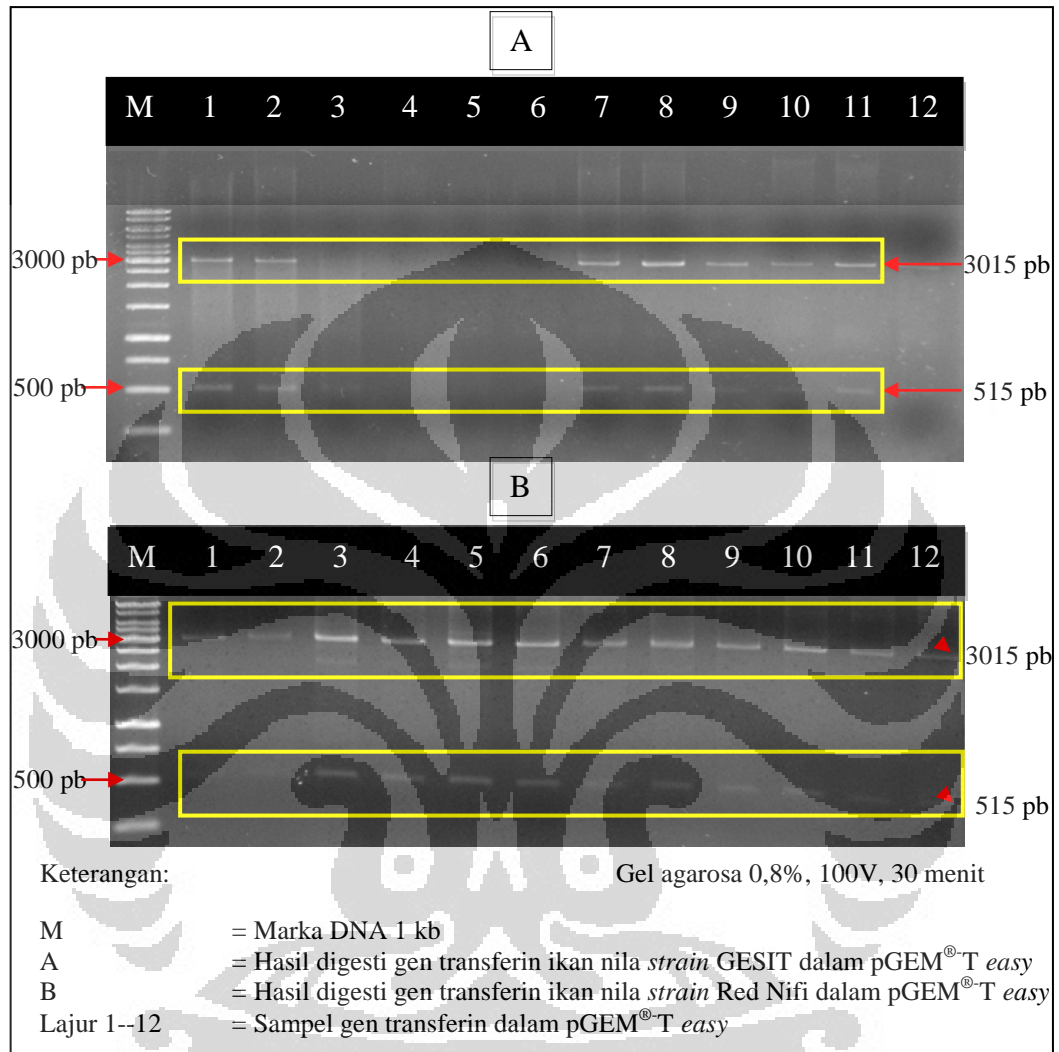
4.1.5. Isolasi Plasmid

Hasil visualisasi isolasi plasmid dapat dilihat pada Gambar 4.1.7.



Gambar 4.1.7. Hasil elektroforesis isolasi plasmid.

Hasil isolasi plasmid kemudian diverifikasi dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Hasil visualisasi proses digesti dapat dilihat pada Gambar 4.1.8.



Gambar 4.1.8. Hasil digesti gen transferin dalam vektor pGEM[®]T *easy*

Gambar 4.1.8. menunjukkan adanya 2 pita DNA yang berukuran 3015 pb dan 515 pb pada sampel gen transferin ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi hasil isolasi plasmid.

4.1.6 Sekuensing dan analisis sekuensing

Koloni hasil isolasi plasmid yang memiliki hasil verifikasi positif kemudian disekuensing. Sekuensing dilakukan oleh laboran dari Laboratorium

Bioteknologi BPPT. Hasil sekuensing gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dapat dilihat pada Lampiran 14, 15, dan 16. Hasil sekuensing yang didapat kemudian dikonfirmasi dengan menggunakan program *blastn* dan *blastx* pada *gene bank*. Program *blastn* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan nukleotida dengan sampel nukleotida yang dimiliki, sedangkan program *blastx* digunakan untuk mendapatkan informasi organisme yang memiliki kesamaan asam amino dengan sampel nukleotida yang dimiliki. Hasil program *blastn* dapat dilihat pada Lampiran 17, 18, dan 19. Hasil program *blastx* dapat dilihat pada Lampiran 20, 21, dan 22.

Sekuen yang sudah dikonfirmasi kemudian dihomologikan dengan menggunakan perangkat lunak *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3*. untuk mengetahui fragmen sekuen yang *conserved* pada ikan nila. Daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutasi pada garis evolusi tertentu (Jegga & Aronow 2006: 1--4). Sekuen gen transferin yang berhasil disekuensing berasal dari ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam. Ketiga *strain* tersebut dihomologikan dengan sekuen gen transferin yang terdapat pada *gene bank*, yaitu sekuen gen transferin *Oreochromis niloticus* (DQ272465.1), *Oreochromis aureus variant 1* (AJ318861.1), *Oreochromis aureus variant 2* (AJ318862.1), dan *Oreochromis mossambicus* (AJ312311.1). Hasil homologi nukleotida gen transferin dapat dilihat pada Lampiran 23, sedangkan hasil homologi asam amino dapat dilihat pada Lampiran 24.

4.1.7 Desain primer

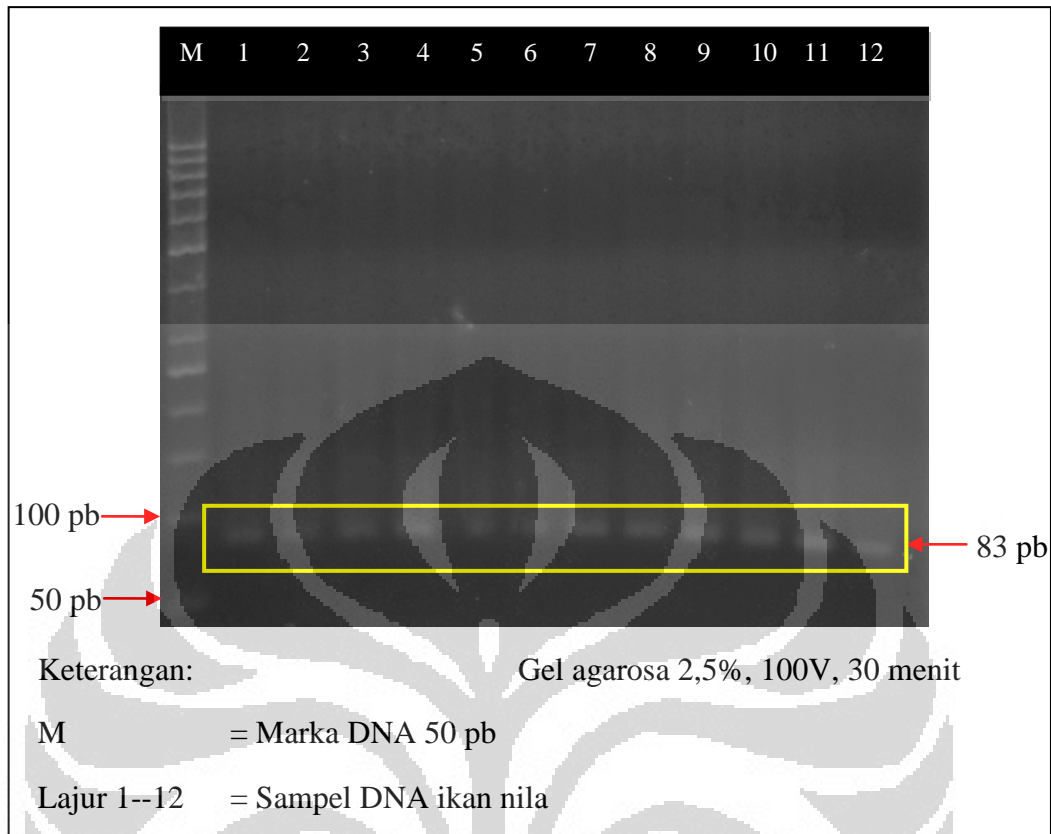
Primer PCR *forward* dan *reverse* didesain secara manual. Situs penempelan primer *forward* dibuat pada bagian yang memiliki perbedaan basa nukleotida dengan gen transferin pada *Oreochromis aureus variant 1* dan 2, serta *Oreochromis mossambicus*. Situs penempelan primer *reverse* dibuat pada bagian akhir daerah homologi gen transferin dari semua sekuen. Primer yang telah dibuat kemudian diuji dengan menggunakan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International*. Perangkat lunak tersebut digunakan untuk melihat nilai

persentase GC, nilai *melting temperature* (T_m), serta struktur sekunder yang dapat terbentuk pada primer. Nilai *melting temperature* (T_m) pada primer merupakan nilai perkiraan suhu *annealing* optimal primer yang akan dibuat. Nilai T_m primer *forward* yang dibuat dapat dilihat pada Lampiran 25, sedangkan nilai T_m primer *reverse* yang dibuat dapat dilihat pada Lampiran 26. Struktur sekunder yang dapat diprediksi oleh perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International* adalah struktur *hairpin*, *self-dimer*, *cross dimer*, dan *palindrome*. *Hairpin* merupakan struktur simpul yang terbentuk akibat adanya reaksi ikatan intramolekular pada suatu primer. Suatu primer dapat membentuk struktur *hairpin* jika terdapat setidaknya 3 basa homolog yang berurutan. Struktur dimer merupakan struktur ikatan yang terjadi antara 2 primer akibat adanya struktur homologi antara kedua primer tersebut. Struktur dimer dapat dibedakan menjadi dua, yaitu *self-dimer* dan *cross dimer*. *Self dimer* dapat terjadi apabila ikatan dimer terjadi pada dua primer yang sejenis (primer *forward* dengan primer *forward* atau primer *reverse* dengan primer *reverse*), sedangkan *cross dimer* dapat terjadi apabila ikatan dimer terjadi pada dua primer yang berbeda jenis (primer *forward* dengan primer *reverse*). *Palindrome* merupakan struktur komplement antara ujung 5' dan 3' pada suatu nukleotida. Prediksi struktur sekunder pada primer *forward* dan primer *reverse* yang dibuat dapat dilihat pada Lampiran 25, 26, 27, 28, 29, 30, dan 31.

Primer yang sudah diuji dengan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International*, kemudian diuji kembali dengan menggunakan perangkat lunak *Primer BLAST*. Perangkat lunak tersebut bertujuan untuk mengetahui gen apa saja yang dapat menempel pada primer yang dibuat. Hasil dari pengujian dengan perangkat lunak *Primer BLAST* dapat dilihat pada Lampiran 32.

4.1.8 Optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR

Primer TrfNF dan primer TrfNR yang sudah dibuat kemudian dioptimasi untuk mengetahui suhu *annealing* optimal kedua primer tersebut. Hasil optimasi PCR gen transferin dengan primer TrfNF dan primer TrfNR dapat dilihat pada Gambar 4.1.9.

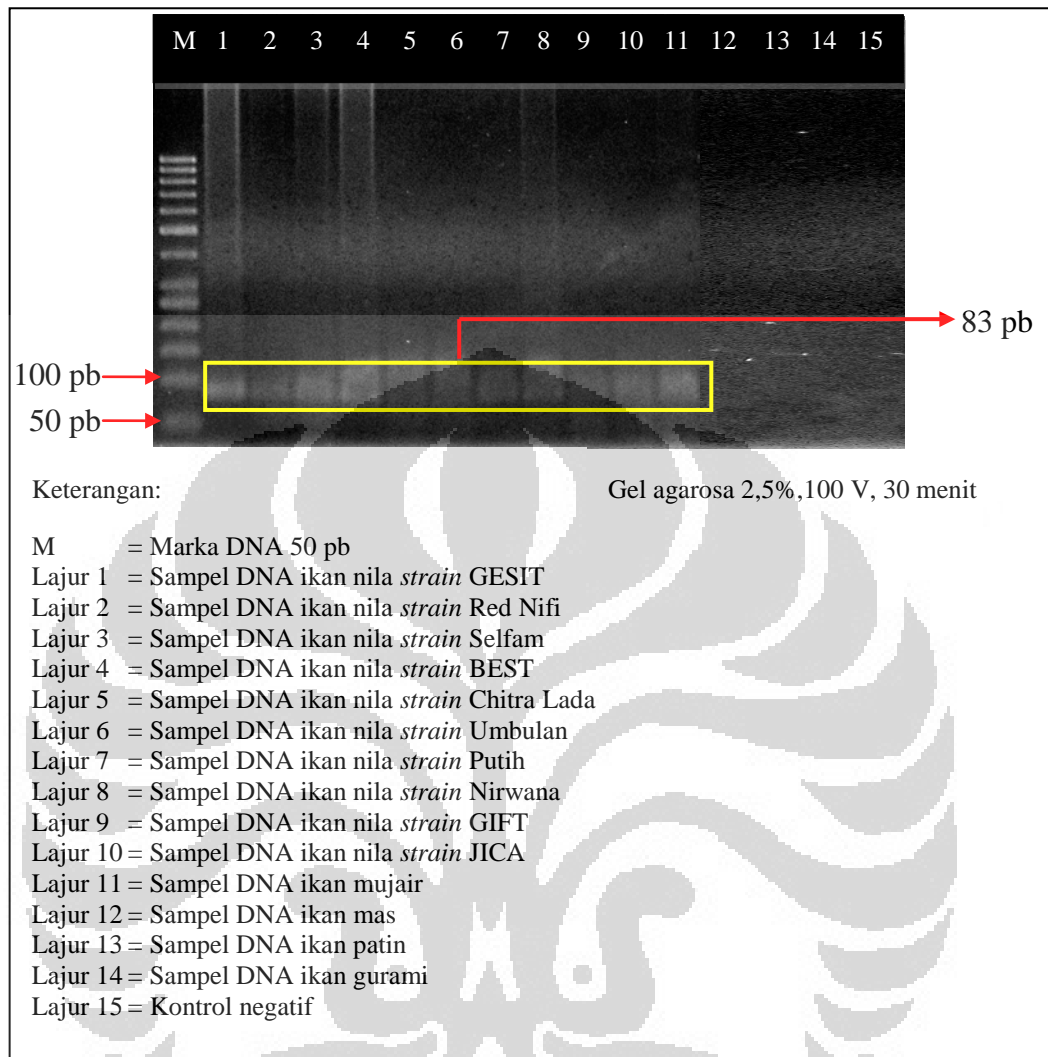


Gambar 4.1.9. Hasil optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR

Gambar 4.1.9. menunjukkan adanya pita DNA berukuran 83 pb pada sampel DNA ikan nila. Suhu *annealing* yang digunakan pada proses optimasi tersebut adalah 49°C sampai 60°C (lajur 1 sampai lajur 12).

4.1.9 Pengujian primer TrfNF dan TrfNR

Suhu *annealing* optimal yang didapatkan dari proses optimasi kemudian digunakan dalam program PCR untuk pengujian primer TrfNF dan primer TrfNR. Hasil pengujian primer TrfNF dan TrfNR dapat dilihat pada Gambar 4.1.10



Gambar 4.1.10. Hasil elektroforesis pengujian primer TrfNF dan primer TrfNR

Gambar 4.1.10. menunjukkan adanya pita DNA berukuran 83 pb pada sampel DNA ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, JICA, dan ikan mujair.

Hasil elektroforesis tersebut kemudian digunakan untuk perhitungan tingkat ekspresi gen transferin dengan perangkat lunak *UN-SCAN-IT Gel Analysis*. Prinsip kerja perangkat lunak tersebut adalah dengan membandingkan *pixel* gambar masing-masing sampel dengan marka DNA sebagai konsentrasi standar (Putranto & Budiani 2009: 6). Sampel yang diukur adalah sampel ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, JICA, dan ikan mujair. Hasil perhitungan tingkat ekspresi gen

transferin pada ikan nila dan ikan mujair dengan menggunakan perangkat lunak *UN-SCAN-IT Gel Analysis* dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi DNA ikan

Ikan nila yang digunakan dalam penelitian dipilih dengan tujuan untuk mewakili populasi *strain* ikan nila yang terdapat di Indonesia. Pemilihan ikan mas, ikan patin, dan ikan gurami sebagai ikan kontrol adalah karena ketiga ikan tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang cukup dekat dengan ikan nila dan merupakan ikan yang umumnya dibudidayakan di Indonesia (Prihatman 2000: 1--2). Hasil pengukuran nilai kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA ikan dengan menggunakan mesin *nano drop spectrophotometer* pada Tabel 4.1 menunjukkan sampel DNA ikan nila hasil isolasi berkisar antara 1,8--1,99. Menurut Thermo Fisher Scientific (2008: 2--5), kemurnian DNA (A_{260}/A_{280}) tergolong baik jika memiliki nilai berkisar antara 1,8--2,0. DNA yang memiliki nilai kemurnian di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi RNA, sedangkan yang memiliki nilai kemurnian di atas 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi protein atau DNA lain. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi juga menunjukkan hasil yang relatif tinggi, yaitu berkisar antara 1384--4985 ng/ μ L. Mesin *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* efektif untuk mengukur konsentrasi di atas 3700 ng/ μ L.

Kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi tersebut tergolong baik. Wasko *dkk.* (2003: 161--162) melakukan isolasi DNA ikan dari sirip kaudal dengan menggunakan metode isolasi DNA yang sama dan didapat nilai kemurnian berkisar antara 1,6--2,2, serta nilai konsentrasi rata-rata 200 ng/ μ L.

Hasil visualisasi ekstraksi DNA pada Gambar 4.1 menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk di atas marka DNA 1 kb. Hal tersebut disebabkan karena DNA genom ikan nila berukuran 16.627 pb, sehingga pita DNA yang terbentuk berada di atas marka (NCBI 1998: 1). Pita DNA pada lajur 2, 3, 5, dan 6 menunjukkan hasil yang tidak terlalu tebal, walaupun memiliki nilai konsentrasi DNA yang relatif tinggi. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena sampel

DNA yang sudah larut dengan *running buffer* elektroforesis, sehingga sampel yang terdapat dalam sumur elektroforesis menjadi lebih sedikit (Geneaid 2010: 3).

4.2.2 Optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1

Hasil optimasi PCR gen transferin DNA genom ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dengan primer TRF F2 dan TRF R1 pada Gambar 4.1.2. Suhu *annealing* merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan reaksi PCR, karena primer akan menempel pada sampel DNA pada suhu *annealing* yang tepat. Munculnya banyak pita DNA yang terbentuk pada suatu proses PCR dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain volume sampel DNA pada proses PCR terlalu banyak, suhu *annealing* terlalu rendah, waktu denaturasi yang terlalu singkat, jumlah siklus PCR yang terlalu banyak, adanya kontaminasi DNA asing, serta kesalahan pada pembuatan primer. Hasil optimasi primer tersebut juga menunjukkan adanya struktur dimer. Struktur dimer yang terbentuk dapat disebabkan karena kesalahan pembuatan primer, sehingga primer menempel satu sama lain (Bartlett & Strirling 200: 97).

Primer yang digunakan pada optimasi reaksi PCR adalah TRF F2 dan TRF R1. Primer tersebut dibuat berdasarkan hasil homologi gen transferin ikan *O. niloticus* (DQ272465.1), *O. aureus variant 1* (AJ318861.1), *O. aureus variant 2* (AJ318862.1), dan *O. mossambicus* (AJ312311.1). Hasil amplifikasi yang diharapkan nantinya memiliki ukuran 800 pb. Suhu *annealing* primer TRF F2 dan TRF R1 dioptimasi dengan menggunakan teknik gradien pada mesin PCR. Teknik gradien PCR merupakan teknik dalam proses optimasi PCR yang bertujuan untuk mengamplifikasi DNA dengan menggunakan beberapa suhu *annealing* yang berbeda dalam satu proses PCR (Özdemir 2009: 496). Rentang suhu *annealing* yang digunakan pada proses optimasi PCR primer TRF F2 dan TRF R1 berkisar antara 56°C sampai 59°C.

4.2.3 Amplifikasi dan ekstraksi gel gen transferin dari cDNA ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi dan DNA genom ikan nila *strain* Selfam

Hasil amplifikasi dan ekstraksi gel gen transferin dari cDNA ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi dan DNA genom ikan nila *strain* Selfam pada Gambar 4.1.3. menunjukkan adanya 2 pita DNA dengan ukuran yang berbeda, yaitu 515 pb untuk sampel cDNA dan 800 pb untuk sampel DNA. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa cDNA merupakan hasil salinan dari mRNA yang sudah tidak memiliki intron (Lodge *dkk.* 2009: 105--109). Target gen transferin yang diamplifikasi oleh primer TRF F2 dan TRF F1 pada sampel DNA ikan nila adalah sebesar 800 pb, yang dimulai pada urutan basa ke-2919 sampai 3717. Daerah ekson pada fragmen gen tersebut berjumlah 515 pb, sedangkan daerah intron berjumlah 285 pb. Daerah ekson terdapat pada basa ke-2875 sampai 3047, basa ke-3154 sampai 3307, basa ke-3393 sampai 3556, dan basa ke-3648 sampai 3744 (NCBI 2000: 1).

Gen transferin pada gel agarosa dari ketiga sampel tersebut kemudian akan diekstraksi dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit*. Hasil ekstraksi gen transferin dari gel agarosa pada Gambar 4.1.4. menunjukkan pita DNA gen transferin setelah proses ekstraksi DNA dari gel terlihat lebih tipis dibandingkan dengan pita DNA sebelum proses ekstraksi DNA dari gel. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena kemampuan penyerapan DNA oleh membran silika yang kurang optimal ataupun larutan elusi yang diberikan terlalu banyak. Larutan elusi yang berlebihan dapat mengakibatkan konsentrasi DNA hasil ekstraksi DNA dari gel menjadi rendah, sehingga pita DNA akan terlihat lebih tipis ketika divisualisasi (Geneaid 2010: 3).

4.2.4 Transformasi gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam

Sampel hasil ekstraksi gen transferin dari gel agarosa kemudian digunakan sebagai DNA *template* dalam proses ligasi ke dalam vektor plasmid pGEM[®]-T *easy*. Hasil ligasi tersebut kemudian ditransformasikan ke dalam sel kompeten

E. coli DH5 α dan di-*spread* ke dalam cawan petri. Hasil proses transformasi pada Gambar 4.1.5. menunjukkan adanya koloni-koloni *E. coli* DH5 α yang tumbuh pada medium SOB padat. Hasil dari proses transformasi dapat dilihat dari warna koloni *E. coli* yang tumbuh pada medium SOB padat. Koloni *E. coli* dapat tumbuh pada medium SOB padat yang mengandung ampisilin, karena memiliki gen resistan ampisilin yang terdapat pada vektor plasmid (Promega 2003: 5). Koloni yang berwarna putih adalah koloni yang memiliki fragmen gen transferin. Koloni tersebut berwarna putih karena adanya penyisipan gen transferin pada vektor, sehingga gen *lac-Z* tidak dapat mengekspresikan enzim β -galaktosidase. Hal tersebut mengakibatkan X-gal tidak dapat terhidrolisis, sehingga zat warna biru tidak dapat terbentuk. Koloni yang berwarna biru menunjukkan bahwa tidak ada gen transferin yang tersisipkan pada vektor, sehingga zat warna biru dapat terbentuk (Griffith *dkk.* 1996: 421).

Jumlah klon yang diperoleh pada proses pengklonaan dipengaruhi oleh nilai efisiensi transformasi. Hasil perhitungan nilai efisiensi transformasi untuk sampel gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dapat dilihat pada Lampiran 12. Nilai efisiensi transformasi untuk sampel gen transferin dari ikan nila *strain* GESIT berkisar antara $3,94 \times 10^3$ cfu/ μ g-- $4,50 \times 10^3$ cfu/ μ g, ikan nila *strain* Red Nifi berkisar antara $4,47 \times 10^3$ cfu/ μ g-- $5,36 \times 10^3$ cfu/ μ g, dan ikan nila *strain* Selfam berkisar antara $5,06 \times 10^3$ cfu/ μ g-- $5,69 \times 10^3$ cfu/ μ g. Nilai efisiensi transformasi yang semakin tinggi menunjukkan bahwa keberhasilan proses transformasi semakin baik (Wong 1997: 131).

Keberhasilan penyisipan gen transferin dari 12 koloni yang muncul kemudian dikonfirmasi dengan menggunakan metode *direct colony* PCR. Primer yang digunakan adalah primer TRF F2 dan TRF R1. Hasil proses konfirmasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.6. Koloni putih dengan hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang berukuran 515 pb untuk sampel ikan nila *strain* GESIT dan Red Nifi, serta pita DNA yang berukuran 800 pb untuk sampel ikan nila *strain* Selfam. Koloni putih dengan hasil negatif tidak menunjukkan adanya pita DNA. Hasil elektroforesis menunjukkan beberapa koloni berwarna putih tidak memiliki DNA target atau memiliki hasil negatif. Hal tersebut kemungkinan dapat disebabkan karena tidak aktifnya ampisilin, sehingga

mikroorganisme lain yang sensitif terhadap ampisilin dapat tumbuh. Koloni tersebut nantinya dapat tumbuh berwarna putih, namun tidak memiliki salinan fragmen gen target di dalamnya (Promega 2003: 18).

4.2.5. Isolasi plasmid

Klona yang memiliki hasil konfirmasi yang positif kemudian ditumbuhkan ke dalam 50 mL SOB cair untuk tahapan isolasi plasmid. Hasil isolasi plasmid kemudian divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Hasil visualisasi isolasi plasmid dapat dilihat pada Gambar 4.1.7. Visualisasi hasil isolasi plasmid yang positif ditunjukkan dengan adanya pita DNA di atas marka DNA. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena bentuk plasmid yang tidak dapat melewati celah pada gel agarosa, sehingga DNA plasmid berada di atas marka DNA. Hasil isolasi plasmid juga dikonfirmasi melalui proses digesti. Proses digesti dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, karena enzim tersebut memiliki dua situs pemotongan pada plasmid pGEM[®]-T *easy*. Hasil positif dari proses digesti adalah 2 pita DNA, yaitu pita DNA dari plasmid pGEM[®]-T *easy* yang berukuran 3015 pb dan pita DNA fragmen gen transferin yang berukuran 515 pb (Promega 2008: 2). Hasil digesti gen transferin dalam plasmid pGEM[®]-T *easy* dapat dilihat pada Gambar 4.1.8.

4.2.6 Sekuensing dan analisis sekuensing

Hasil sekuensing dari sampel gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, dan Selfam dikonfirmasi dengan menggunakan program *blastn* dan *blastx* pada *gene bank*. Hasil konfirmasi *blastn* gen transferin ikan nila *strain* GESIT menunjukkan nilai kesamaan sebesar 98% dengan gen transferin *O. niloticus* (Lampiran 17), sedangkan hasil konfirmasi *blastx* menunjukkan nilai kesamaan sebesar 92% dengan protein transferin *O. niloticus* (Lampiran 20). Hasil konfirmasi *blastn* gen transferin ikan nila *strain* Red Nifi menunjukkan nilai kesamaan sebesar 98% dengan gen transferin *O. niloticus* (Lampiran 18), sedangkan hasil konfirmasi *blastx* menunjukkan nilai kesamaan sebesar 90%

dengan protein transferin *O. niloticus* (Lampiran 21). Hasil konfirmasi *blastn* gen transferin ikan nila *strain* Selfam menunjukkan nilai kesamaan sebesar 98% dengan gen transferin *O. niloticus* (Lampiran 19), sedangkan hasil konfirmasi *blastx* menunjukkan nilai kesamaan sebesar 90% dengan protein transferin *O. niloticus* (Lampiran 22). Hasil tersebut merupakan hasil konfirmasi yang dapat dipercaya, karena memiliki nilai kesamaan diatas 90%.

Gen transferin hasil sekuensing yang sudah dikonfirmasi kemudian dihomologikan dengan sekuen gen transferin yang terdapat pada *gene bank*. Hasil homologi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 23. Hasil tersebut menunjukkan adanya beberapa fragmen nukleotida yang memiliki kesamaan nukleotida (daerah *conserved*). Daerah *conserved* merupakan suatu daerah sekuen nukleotida yang mengalami sedikit perubahan atau mutasi pada garis evolusi tertentu (Jegga & Aronow 2006: 1--4). Daerah homologi yang dipilih untuk proses pembuatan primer PCR adalah daerah yang memiliki perbedaan basa nukleotida antara sampel dengan ikan kontrol. Sampel pada homologi tersebut adalah hasil sekuensing gen transferin ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, dan sekuen gen transferin *O. niloticus* yang didapat dari *gene bank*. Sampel kontrol yang digunakan adalah sekuen gen transferin *O. aureus variant 1*, *O. aureus variant 2*, dan *O. mossambicus* yang didapat dari *gene bank*. Daerah tersebut memiliki perbedaan 2 basa nukleotida (basa GG menjadi AG) dan memiliki fragmen homologi sebesar 83 pb. Fragmen pembeda tersebut nantinya akan menjadi situs penempelan primer *forward* yang akan dibuat, sedangkan daerah akhir homologi akan menjadi situs penempelan primer *reverse*. Homologi asam amino juga dilakukan untuk memperkuat daerah *conserved* antara semua sekuen tersebut. Hasil homologi asam amino menunjukkan adanya daerah *conserved* antara semua sekuen tersebut (Lampiran 24). Hal tersebut menunjukkan bahwa daerah *conserved* hasil homologi nukleotida gen transferin sesuai dengan daerah *conserved* hasil homologi asam amino gen transferin.

4.2.7 Desain Primer

Daerah *conserved* hasil homologi nukleotida gen transferin menjadi dasar untuk pembuatan primer. Daerah penempelan primer *forward* dibuat pada daerah yang memiliki perbedaan basa. Hal tersebut bertujuan agar primer tersebut tidak dapat menempel pada sampel yang tidak diinginkan. Primer PCR yang baik memiliki ciri-ciri antara lain berukuran 18--30 basa, memiliki nilai *melting temperature* (T_m) 52°C sampai 60°C, memiliki nilai persentase GC sebesar 45%--60%, memiliki nilai spesifisitas penempelan yang tinggi, dan tidak terdapat struktur sekunder pada primer tersebut (Abd-Elsalam 2003: 94--95). Primer yang dibuat memiliki ukuran sebesar 19 basa untuk primer *forward* dan 18 basa untuk primer *reverse*.

Primer yang telah dibuat kemudian diuji dengan menggunakan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International*. Perangkat lunak tersebut mampu untuk melihat nilai persentase basa G dan C (%GC) pada suatu primer, nilai T_m , dan prediksi struktur sekunder pada primer yang akan dibuat. Nilai persentase GC pada primer yang dibuat adalah 57,9% untuk primer *forward* (Lampiran 25) dan 50% untuk primer *reverse* (Lampiran 26). Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), nilai tersebut tergolong baik karena berkisar antara 45%--60%. Nilai persentase GC berpengaruh pada nilai T_m dan suhu *annealing* optimal primer pada proses PCR. Nilai persentase GC yang terlalu tinggi mengakibatkan suhu *annealing* optimal juga semakin tinggi, demikian pula sebaliknya. Nilai T_m untuk primer yang dibuat adalah 54,38°C untuk primer *forward* (Lampiran 25) dan 53,53°C untuk primer *reverse* (Lampiran 26). Nilai T_m tersebut menunjukkan rentang yang cukup baik. Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), primer yang memiliki nilai T_m antara 52°C sampai 58°C akan menghasilkan produk PCR yang baik. Nilai T_m antara primer *forward* dan *reverse* juga harus hampir sama. Perbedaan suhu yang cukup jauh antara kedua primer tersebut dapat mengakibatkan hanya salah satu primer saja yang berfungsi (McPherson *dkk.* 1995: 8). Struktur sekunder primer yang akan dibuat juga dapat diprediksi dengan menggunakan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International*. Struktur sekunder tersebut antara lain adalah struktur *hairpin*, *self-*

dimer, *cross dimer*, dan *palindrome*. Primer yang memiliki struktur *hairpin*, *self-dimer*, *cross dimer*, dan *palindrome* memungkinkan untuk tidak berfungsi. Oleh karena itu, primer yang akan dibuat harus tidak memiliki semua struktur tersebut (Premier Biosoft International 2009: 9--10). Primer yang didesain menunjukkan tidak adanya struktur *hairpin*, *self-dimer*, *cross dimer*, dan *palindrome* (Lampiran 25, 26, 27, 28, 29, 30, dan 31).

Primer yang sudah diuji dengan perangkat lunak *NetPrimer PREMIER Biosoft International* kemudian akan diuji dengan menggunakan program *Primer BLAST* dari *gene bank*. Program tersebut bertujuan untuk melihat spesifisitas dari primer yang akan dibuat. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa primer yang didesain dapat menempel secara spesifik terhadap gen transferin *Oreochromis niloticus* (Lampiran 32). Hasil yang didapat juga menunjukkan bahwa primer yang didesain memiliki perbedaan beberapa nukleotida dengan gen transferin *Oreochromis aureus* dan *Oreochromis mossambicus*. Program *primer blast* juga memberikan informasi tentang panjang produk PCR yang dapat diamplifikasi dan suhu *annealing* dari primer tersebut.

4.2.8 Optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR

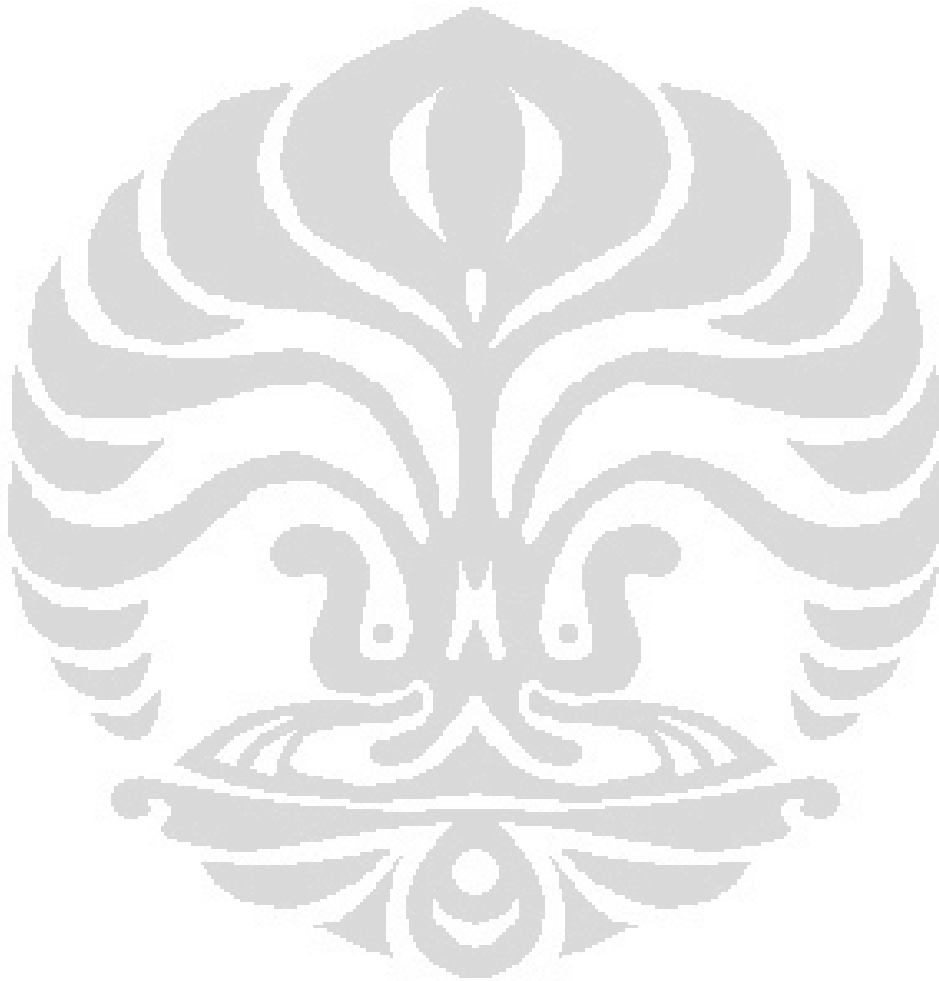
Hasil optimasi PCR dengan primer TrfNF dan TrfNR dapat dilihat pada Gambar 4.1.9. Gambar tersebut menunjukkan adanya sebuah pita DNA yang berukuran 83 pb. Hampir seluruh suhu *annealing* pada proses optimasi PCR tersebut menunjukkan pita DNA yang tunggal. Perbedaan yang terlihat pada pita DNA yang terbentuk adalah adanya bentuk *smear*. Bentuk *smear* terlihat pada sampel dengan suhu *annealing* rendah. Hal tersebut antara lain dapat disebabkan karena volume sampel DNA pada proses PCR terlalu banyak, suhu *annealing* terlalu rendah, waktu denaturasi yang terlalu singkat, jumlah siklus PCR yang terlalu banyak, adanya kontaminasi DNA asing, serta kesalahan pada pembuatan primer (Bartlett & Strirling 200: 97). Suhu *annealing* yang didapatkan pada proses optimasi PCR adalah 60°C, karena pita DNA yang terbentuk pada suhu *annealing* tersebut menunjukkan pita DNA tunggal tanpa adanya bentuk *smear*.

4.2.9 Pengujian primer TrfNF dan TrfNR

Hasil pengujian primer TrfNF dan primer TrfNR dapat dilihat pada Gambar 4.1.10. Gambar tersebut menunjukkan bahwa primer yang didesain mampu mengamplifikasi gen transferin 10 *strain* ikan nila dengan panjang target produk PCR sebesar 83 pb. Namun, primer yang didesain juga mampu mengamplifikasi gen transferin pada ikan mujair. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena jumlah nukleotida pembeda yang terlalu sedikit, sehingga masih memungkinkan primer dapat menempel pada gen transferin ikan mujair. Selain itu, dapat dilihat bahwa sekuen gen transferin pada ikan nila dan ikan mujair memiliki nilai homologi sekitar 98%. Tingginya nilai homologi kedua sekuen gen transferin tersebut memungkinkan primer dapat mengamplifikasi keduanya, walaupun terdapat perbedaan beberapa nukleotida (Abd-Elsalam 2003: 94--95). Primer TrfNF dan primer TrfNR tidak mampu mengamplifikasi gen transferin ikan mas, ikan patin, dan ikan gurami. Hal tersebut disebabkan karena hubungan kekerabatan ikan nila dengan ketiga ikan tersebut berada pada tingkat *Ordo*.

Tingkat ekspresi gen transferin ikan nila diukur dengan menggunakan perangkat lunak *UN-SCAN-IT Gel Analysis*. Prinsip kerja perangkat lunak tersebut adalah dengan membandingkan *pixel* gambar masing-masing sampel dengan menggunakan marka DNA sebagai konsentrasi standar (Putranto & Budiani 2009: 6). Pengukuran tersebut dilakukan dengan konsentrasi standar marka DNA 50 pb sebesar 800 ng. Hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada Lampiran 13. Hasil pengukuran tingkat ekspresi gen transferin pada ikan nila dan ikan mujair menunjukkan bahwa ikan nila *strain* BEST memiliki konsentrasi tertinggi, yaitu 80,85 ng. Ikan mujair memiliki konsentrasi sebesar 0,9 ng. Hal tersebut menunjukkan bahwa ikan nila mampu untuk mengekspresikan gen transferin lebih tinggi daripada ikan mujair. Ikan nila memiliki tingkat ekspresi yang lebih tinggi, kemungkinan disebabkan karena primer TrfNF dan primer TrfNR didesain spesifik untuk ikan nila sehingga gen transferin pada ikan nila mampu teramplifikasi secara optimal. Gen transferin yang teramplifikasi secara optimal menjadikan pita DNA yang terbentuk menjadi tebal, sehingga nilai pixel

gambar menjadi lebih tinggi. Kespesifikan primer TrfNF dan primer TrfNR juga memengaruhi pengukuran tingkat ekspresi ikan mujair dengan menggunakan perangkat lunak *UN-SCAN-IT Gel Analysis*. Perbedaan basa nukleotida pada situs penempelan primer forward kemungkinan mengakibatkan gen transferin pada ikan mujair tidak teramplifikasi secara optimal. Proses amplifikasi yang tidak optimal tersebut menjadikan pita DNA yang terbentuk relatif tipis, sehingga nilai pixel gambar menjadi lebih rendah.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Primer TrfNF (CAGTKAGGCTYTTGMGGRTG) dan primer TrfNR (TAAKGGAAYGGMCGATRC) mampu mengamplifikasi gen transferin dari ikan nila *strain* GESIT, Red Nifi, Selfam, BEST, Chitra Lada, Umbulan, Putih, Nirwana, GIFT, dan JICA dengan ukuran 83 pb.

5.2. Saran

Perlu dilakukan sekuensing gen transferin dari semua *strain* ikan nila untuk mengetahui adanya kemungkinan perubahan daerah *conserved* pada gen transferin ikan nila. Analisis dengan teknik mikrosatelit dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) juga perlu dilakukan untuk mengetahui perbedaan basa nukleotida gen transferin ikan nila dengan ikan lain.

DAFTAR REFERENSI

- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*. **2** (5): 91--95.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh & I. Nakayama. 2006. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science*. **62**: 727--730.
- Bartlett, J.M.S. & D. Stirling. 2000. *Methods in molecular biology: PCR protocols*. 2nd ed. Humana Press, New Jersey: iv + 531 hlm.
- Brooker, R.J. 2005. *Genetics: Analysis and principles*. McGraw Hill Companies, Inc., Boston: xxii + 842 hlm.
- Cowrie Genetic Database Project. 2010. *DNA amplification*. November 2005. 1 hlm. <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>. 08 Januari 2011, pk.09.44.
- Davis, L., M. Kuehl, & J. Battey. 1994. *Basic methods: Molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwola: xii + 777 hlm.
- Direktorat Jendral Perikanan Budidaya. 2011. Ikan nila indukan unggulan. 18 April 2011. 1 hlm. http://www.perikananbudidaya.kkp.go.id/index.php?option=com_content&view=article&id=107:ikan-nila-indukan-unggulan&catid=57:berita. 13 Desember 2011, pk. 13.08.
- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, London: xix + 820 hlm.
- Frackman, S. & D. Kephart. 1999. Rapid ligation for the pGEM®-T and pGEM® T Easy Vector Systems. 4 hlm. http://www.promega.com/pnotes/71/7807_08/7807_08_core.pdf. 05 April 2011, pk. 09.21.
- Geneaid. 2010. *Gel/PCR DNA fragments extraction kit protocols*. Geneaid Biotech Ltd., Taipei: 3 hlm.
- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin & W.M. Gelbart. 1996. *An introduction to genetic analysis*. W.H Freeman and Company, NY: xvii + 860 hlm.
- Integrated Taxonomic Information System. 2010. *Oreochromis niloticus*,

- Linnaeus 1758. 05 Maret 2011: 2 hlm.
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=638762. 05 Maret 2011, pk. 12.44
- Jegga, A.G. & B.J. Aronow. 2006. Evolutionarily conserved noncoding DNA. *Encyclopedia of Life Sciences*. **32**: 1--7.
- Lawrence, E. 1989. *Henderson's dictionary of biological terms*. 10th ed. John Will & Sons, New York: ix + 637 hlm.
- Lee, J.Y., T. Tada, I. Hirono & T. Aoki. 1998. Molecular cloning and evolution of transferrin cDNAs in salmonids. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **7** (4): 287--293.
- Leonard, D., M. Kueh & J. Battley. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appletown & Lange Norwalk, Connecticut: xiv + 777hlm.
- Lodge, J., P. Lund & S. Minchin. 2007. Gene cloning: Principles and applications. Taylor & Francis Group, New York: ix + 462 hlm.
- Lopera-Barrero, N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacomento & T. da Silva Lopes. 2008. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigacion Agraria* **35** (1): 65--74.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: nucleic acids*. Bios scientific Publisher, Oxford: xvi + 175 hlm.
- McKnight, G.S., D.C. Lee, D. Heeaplarth, C.A. Finch & R.D. Palmiter. 1980. Regulation of mRNA transcription in chicken liver by steroid hormones and iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **255**: 148--153.
- McPherson, M.J., P. Quirke & G.R. Taylor. 1991. *PCR: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford: xxi + 253 hlm.
- McPherson, M.J., B.D. Hames & G.R. Taylor. 1995. *PCR 2: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford: xxv + 332 hlm.
- NCBI. 2009. *Oreochromis niloticus* mitochondrion, complete genome. 22 Desember: 1 hlm. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_013663.1, 4 Oktober 2011, pk. 09.06.

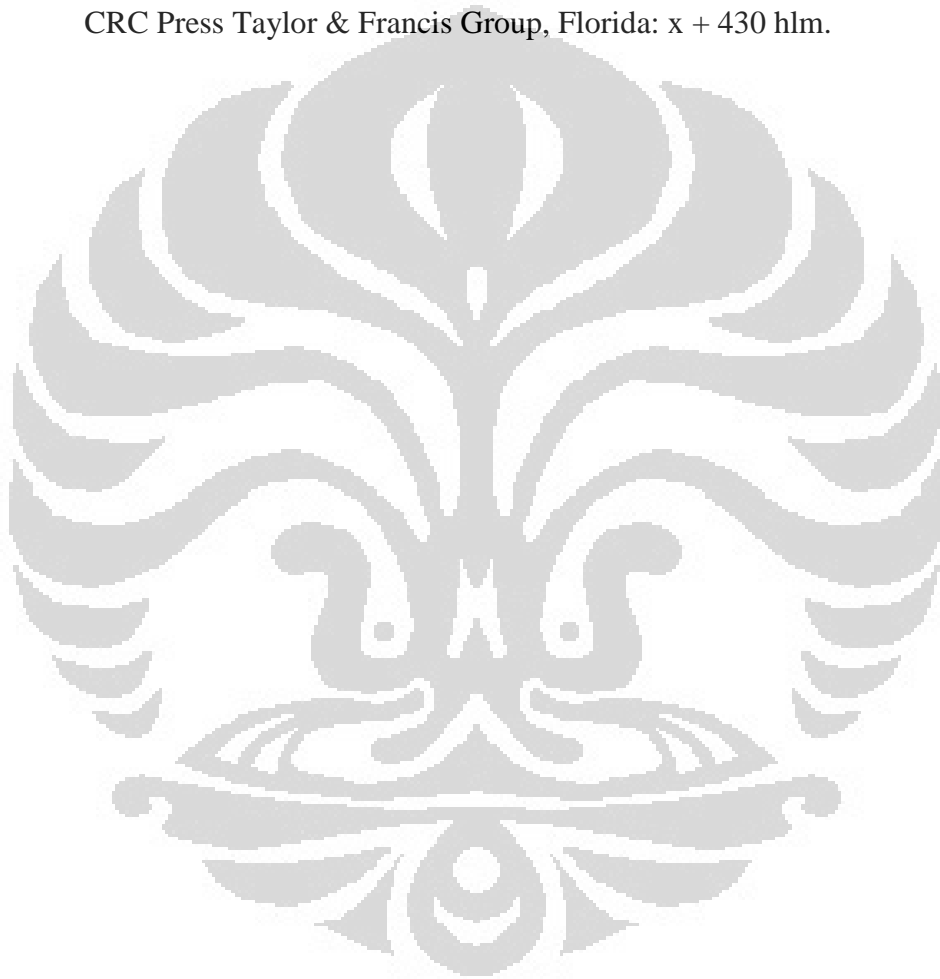
- NCBI. 2007. *Oreochromis niloticus* transferrin (TRF) gene, complete cds: 1 hlm.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/89475214>, 4 Oktober 2011, pk.
09.47.
- Nugroho, B.T. 2009. Identifikasi dan level ekspresi gen transferin pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Tesis S2 – Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang: viii + 56 hlm.
- Okumus, I. & Y. Ciftci. 2003. Fish population genetics and molecular markers: II- molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **3**: 51--79.
- Old, R. W. & S. B. Primrose. 1985. *Prinsip-prinsip manipulasi gen: suatu pengantar rekayasa genetik*. Blackwell Scientific Publications, Oxford: ix + 438 hlm.
- Özdemir, Z. 2009. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. *Journal of Plant Pathology* **91** (2): 495--496.
- Paolella, P. 1998. *Introduction to molecular biology*. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xiii + 241 hlm.
- Prihatman, K. 2000. Budidaya ikan nila. Maret 2000. 14 hlm.
<http://www.warintek.ristek.go.id/perikanan/air%20tawar/nila.pdf>. 13 Februari 2011, pk. 16.22.
- Premier Biosoft International. 2009. *Net Primer Manual*. Premier Biosoft International Inc, Palo Alto: 12 hlm.
- Promega. 2003. *Technical manual pGEM[®]-T and pGEM[®]-T easy vector systems*. Promega Corporation, Madison: 30 hlm.
- Putranto, R.A. & A. Budiani. 2009. Isolasi fragmen gen LIPASE dari kapang *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*. *Menara Perkebunan* **77** (1): 1--12.
- Rengmark, A.H. & F. Lingaas. 2007. Genomic structure of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) transferrin gene and a haplotype associated with salt water tolerance. *Science Direct Aquaculture* **272**: 146--155.

- Ridha, M.T. 2008. Preliminary observation on salinity tolerance of three sizes of the GIFT and non-improved strains of the Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *European Journal of Scientific Research* **24** (3): 373--377.
- Russell, P.J. 1990. *Genetics*. 5th ed. Addison Wesley Longman, Inc., California: xxi + 805 hlm.
- Russell, P. J. 1994. *Fundamental of genetics*. Harper Collins Publishers, New York: xvi + 622 hlm.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxxviii + 5.31 + 6.9 hlm.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A. 14.1 + R.22 + 1.44 hlm.
- Sanz, A., L. Ordovas, C. Serrano, P. Zaragoza, J. Altarriba & C. Rodellar. 2010. A single nucleotide polymorphism in the coding region of bovine transferin is associated with milk fat yield. *Genetics and Molecular Research* **9** (2): 843--848.
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York: xix + 840 hlm.
- Sucipto, A. 2010. *Beberapa strain ikan nila di Indonesia*. 1 hlm.
<http://www.adisucipto.com/aquatika/beberapa-strain-ikan-nila-di-indonesia.html>. 13 Desember 2011, pk. 12.39.
- Thermo Fisher Scientific. 2008. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual*. Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington: 19-4 hlm.
- Thermo Fisher Scientific. 2011. 1 hlm. EcoRI.
<http://www.fermentas.com/en/products/all/conventional-restriction-enzymes/er027-ecori>. 05 April 2011, pk. 09.04.
- Wasko, A.P., C. Martins, C. Oliveira & F. Foresti. 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* **138**: 161—165.
- Wong, D.W.S. 1997. *The ABC of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.

Wurts, W.A. 1998. Why can some fish live in freshwater, some in salt water, and some in both ?. *World Aquaculture* **29** (1): 65.

Yin, Y., C.K. Lin & J.S. Diana. 2002. Nineteenth annual technical report culture of red tilapia in brackishwater ponds. 3 hlm
<http://www.pdacrsp.oregonstate.edu/pubs/technical/19tch/9NS4.pdf>. 20 Februari 2011, pk. 16.27.

Zalups, R.K. & J. Koropatnick. 2010. *Cellular and Molecular Biology of Metals*. CRC Press Taylor & Francis Group, Florida: x + 430 hlm.



Lampiran 1

Komposisi dan preparasi larutan yang digunakan dalam penelitian

Reagen	Komposisi	Acuan
TNES-Urea <i>Lysis Buffer</i>	Tris HCl 10 mM, NaCl 125 mM, EDTA, 10 mM, SDS 0,5%, dan urea 4M dicampurkan hingga mencapai volume akhir 1 liter.	Asahida <i>dkk.</i> 2006:728
<i>Alkaline Lysis Solution I</i>	50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8,0), dan 10 mM EDTA (pH 8,0) dilarutkan dalam 100 mL ddH ₂ O	Sambrook & Russell 2001: A1.16
<i>Alkaline Lysis Solution II</i>	0,2 N NaOH dan 1% (w/v) SDS dilarutkan dengan ddH ₂ O sampai volume tertentu	Sambrook & Russell 2001: A1.16
<i>Alkaline Lysis Solution III</i>	60 mL 5M potasium asetat dan 11,5 mL larutan asam asetat glasial dicampurkan dengan 28,5 mL ddH ₂ O	Sambrook & Russell 2001: A1.16
TE <i>Buffer</i> (pH 8,0)	Larutan stok: 10x TE 100 mM Tris-Cl (pH 8,0) dan 10 mM EDTA (pH 8,0) dilarutkan dengan ddH ₂ O sampai volume tertentu	Sambrook & Russell 2001: A1.7

(Lanjutan)

Reagen	Komposisi	Acuan
Proteinase K (20 mg/mL)	Bubuk proteinase-K dilarutkan dengan 50 mM Tris (pH 8,0) steril dan 1,5 mM kalsium asetat.	Sambrook & Russell 2001: A1.7
TBE Buffer	Larutan stok: 10x TBE 108 g Tris base, 55 g asam boraks, dan 40 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) dilarutkan dengan ddH ₂ O hingga mencapai volume 1 l	Sambrook & Russell 2001: A1.17
6x <i>Loading buffer</i> elektroforesis tipe III	0,25% (w/v) bromofenol biru, 025% (w/v) xylene cyanol FF, dan 30% (v/v) gliserol dalam H ₂ O ditambahkan ddH ₂ O sampai volume tertentu	Sambrook & Russell 2001: A1.19
Fenol (25) : Kloroform (24) : Isoamil Alkohol (1)	Larutan fenol, kloroform, dan isoamyl alkohol dicampurkan dengan volume tertentu dengan perbandingan 25:24:1	Sambrook & Russell 2001: A1.23

(Lanjutan)

Reagen	Komposisi	Acuan
Ethidium Bromida (10 mg/mL)	1 g ethidium bromida dilarutkan dengan 100 mL H ₂ O, kemudian disimpan pada wadah gelap ataupun dilapisi dengan pembungkus aluminium	Sambrook & Russell 2001: A1.26
RNAse (1 mg/mL)	2 mg bubuk RNAse dilarutkan dengan 2 mL TE (pH 7,6)	Sambrook & Russell 2001: A1.8

Lampiran 2

Primer yang digunakan dalam penelitian

Nama primer	Sekuen	Ukuran pita DNA
TRF F2	5'TTGACAACTATRAMRCCTGCTYCC 3'	584 pb
TRF R1	5'CAGCSGTAAACACCTGACCT 3'	
TrfNF	5'CAGTKAGGCTYTTGMGGRTG 3'	83 pb
TrfNR	5'TAAKGGAAYGGMCGATRC 3'	

Lampiran 3

Komposisi dan cara pembuatan medium SOB dan SOC

Komposisi:

Tripton

Ekstrak khamir

NaCl

KCl 250 mM

Glukosa 1M

pH 7

Cara pembuatan medium SOB cair:

Satu liter medium SOB dibuat dengan melarutkan 20 g tripton, 5 g ekstrak khamir, 0,5 g NaCl, dan 10 mL KCl 250 mM dengan H₂O. Campuran diaduk hingga homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Tingkat keasaman (pH) larutan diatur hingga mencapai pH 7 dengan menambahkan NaOH 5M. Larutan SOB cair kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

Cara pembuatan medium SOB agar:

Medium SOB agar dibuat seperti cara di atas, tetapi ditambahkan 20 g/L bubuk agar sebelum diautoklaf. Larutan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

Cara pembuatan medium SOC cair:

Medium SOC memiliki komposisi yang hampir sama dengan medium SOB. Sebanyak 20 mL/L larutan glukosa 1M steril ditambahkan pada medium SOB yang sudah diautoklaf dan sudah memiliki suhu sekitar 60°C. Medium disimpan pada suhu ruang atau 4° C.

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: A2.3.]

Lampiran 4

Komposisi reaksi PCR untuk mengamplifikasi gen transferin

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	6
20 μM primer TRF F2	0,5
20 μM primer TRF R1	0,5
2 mM dNTP	1
10x <i>buffer</i> DNA <i>Taq</i> polymerase	1
5u/ μL <i>Taq</i> polymerase	0,1
20--50 ng/ μL sampel DNA	1
TOTAL	10

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 8.21.]

Lampiran 5

Komposisi reaksi PCR uji primer untuk mengamplifikasi gen transferin

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	6
20 μM primer TrfNF	0,5
20 μM primer TrfNR	0,5
2 mM dNTP	1
10x <i>buffer</i> DNA <i>Taq</i> polymerase	1
5u/ μL <i>Taq</i> polymerase	0,1
20--50 ng/ μL sampel DNA	1
TOTAL	10

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 8.21.]

Lampiran 6

Komposisi reaksi digesti ampikon gen transferin

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	12
10x <i>buffer</i> EcoRI	2
10u/ μL EcoRI	1
Ampikon	5
TOTAL	20

[Sumber: Thermo Fisher Scientific Inc. 2011: 1.]

Lampiran 7

Komposisi reaksi ligasi gen transferin

Bahan	Volume (μL)
Sampel DNA	5
Plasmid pGEM [®] T <i>easy</i>	2
2x <i>ligation buffer</i>	9
T4 DNA ligase	4
TOTAL	20

[Sumber: Frackman & Kephart 1999: 1--2.]

Lampiran 8

Program optimasi PCR gen transferin dengan primer TRF F2 dan TRF R1

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus	Gradien
Pra-denaturasi	95°C	3 menit	-	-
Denaturasi	95 °C	20 detik	35	-
<i>Annealing</i>	55 °C	35 detik	35	10
Elongasi	72 °C	1 menit	35	-
Preservasi	4 °C	∞	-	-

Lampiran 9

Program PCR gen transferin dengan primer TRF F2 dan primer TRF R1

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
Pra-denaturasi	95°C	3 menit	-
Denaturasi	95 °C	20 detik	35
<i>Annealing</i>	59 °C	35 detik	35
Elongasi	72 °C	1 menit	35
Preservasi	4 °C	∞	-

Lampiran 10

Program optimasi PCR gen transferin dengan primer TrfNF dan primer TrfNR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus	Gradien
Pra-denaturasi	95°C	3 menit	-	-
Denaturasi	95 °C	20 detik	35	-
<i>Annealing</i>	55 °C	35 detik	35	10
Elongasi	72 °C	1 menit	35	-
Preservasi	4 °C	∞	-	-

Lampiran 11

Program PCR gen transferin dengan primer TrfNF dan TrfNR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
Pra-denaturasi	95°C	3 menit	-
Denaturasi	95 °C	20 detik	35
<i>Annealing</i>	60 °C	35 detik	35
Elongasi	72 °C	1 menit	35
Preservasi	4 °C	∞	-

Lampiran 12

Pengukuran efisiensi transformasi

Ef. transformasi	= $\frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{rasio pengenceran} \times \text{vol. transformasi}}{\text{vol. kultur} \times \text{konsentrasi DNA}}$
------------------	---

[Sumber: Promega 1999: 11.]

Ikan nila *strain* GESIT
(ulangan pertama) = $\frac{295 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,350 \mu\text{g}}$

= $4,21 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* GESIT
(ulangan kedua) = $\frac{315 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,350 \mu\text{g}}$

= $4,50 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* GESIT
(ulangan ketiga) = $\frac{276 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,350 \mu\text{g}}$

= $3,94 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* Red Nifi
(ulangan pertama) = $\frac{237 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,265 \mu\text{g}}$

= $4,47 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* Red Nifi
(ulangan kedua) = $\frac{255 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,265 \mu\text{g}}$

= $4,81 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* Red Nifi
(ulangan ketiga) = $\frac{284 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,265 \mu\text{g}}$

= $5,36 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

Ikan nila *strain* Selfam
(ulangan pertama) = $\frac{176 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,174 \mu\text{g}}$

= $5,06 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$

$$\text{Ikan nila strain Selfam (ulangan kedua)} = \frac{182 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,174 \mu\text{g}}$$

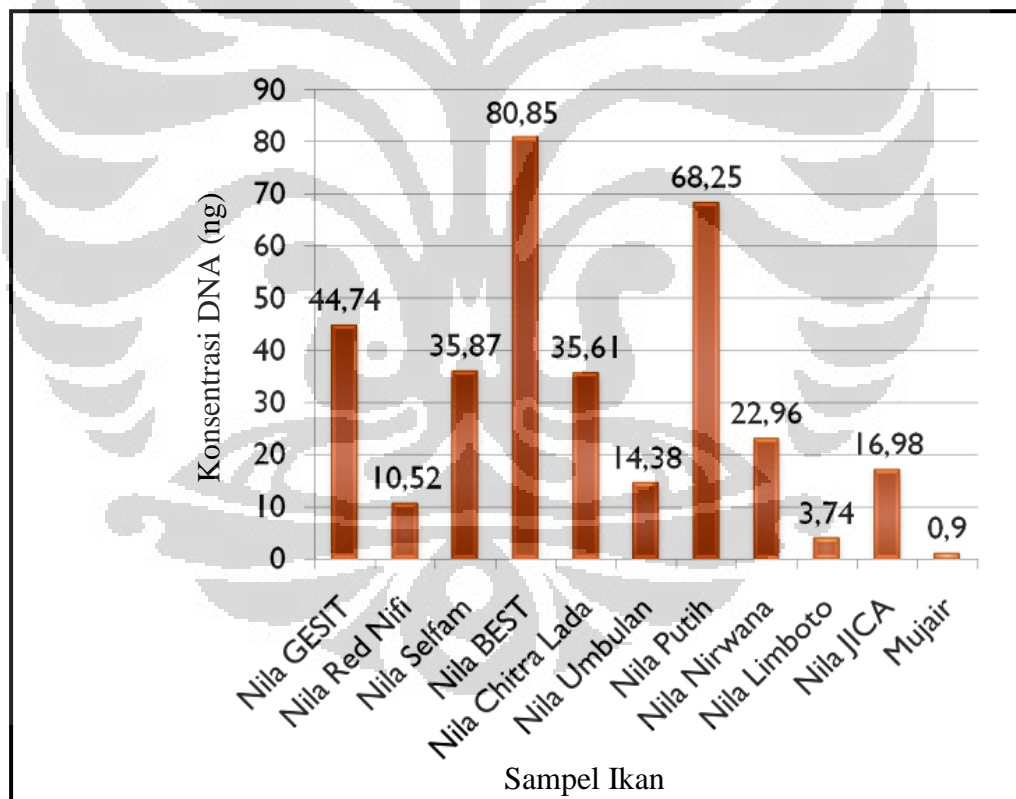
$$= 5,23 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

$$\text{Ikan nila strain Selfam (ulangan ketiga)} = \frac{198 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{200 \mu\text{l} \times 0,174 \mu\text{g}}$$

$$= 5,69 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

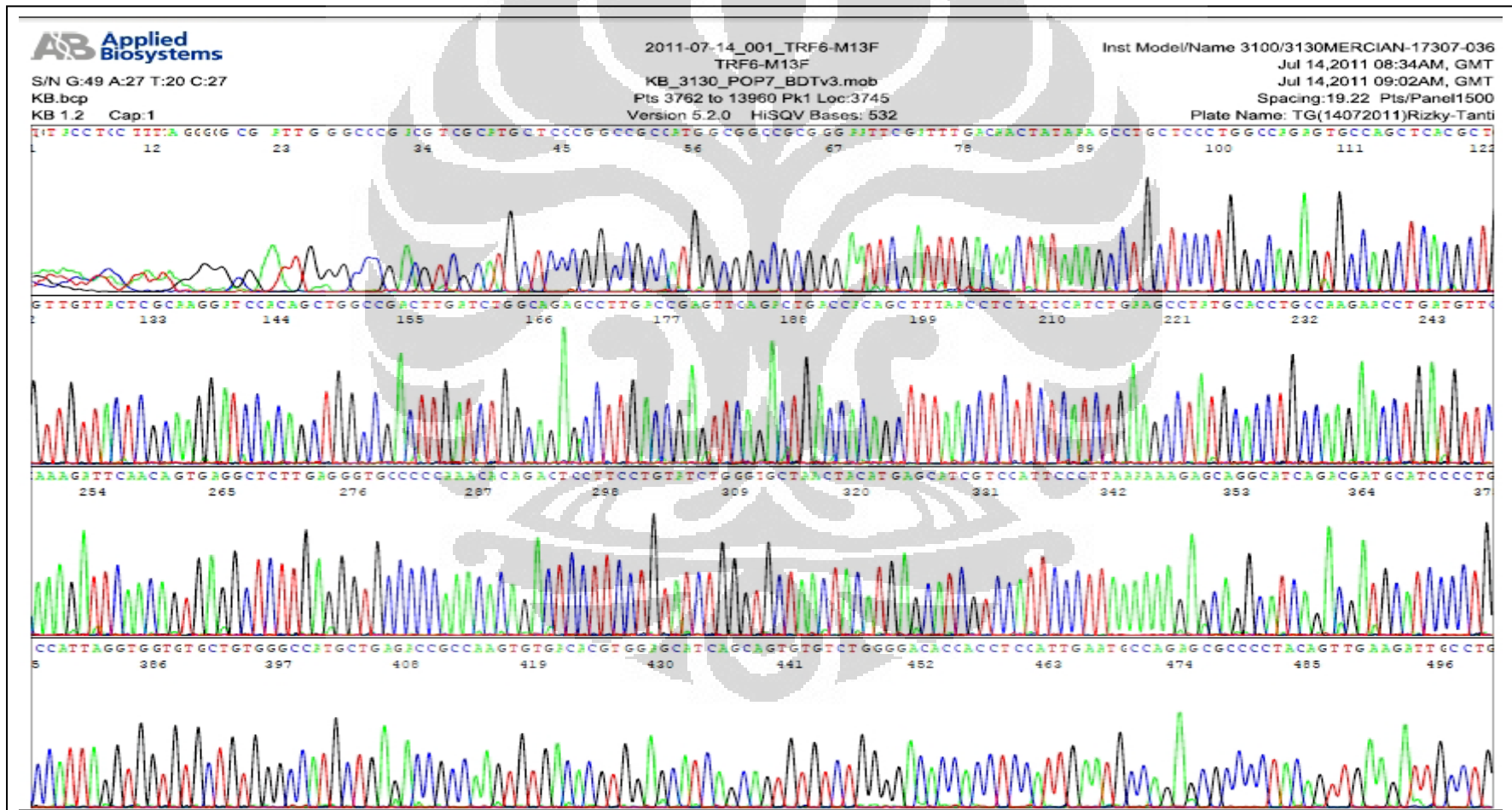
Lampiran 13

Hasil pengukuran tingkat ekspresi gen transferin ikan nila dan ikan mujair dengan perangkat lunak *UN-SCAN-IT Gel Analysis*



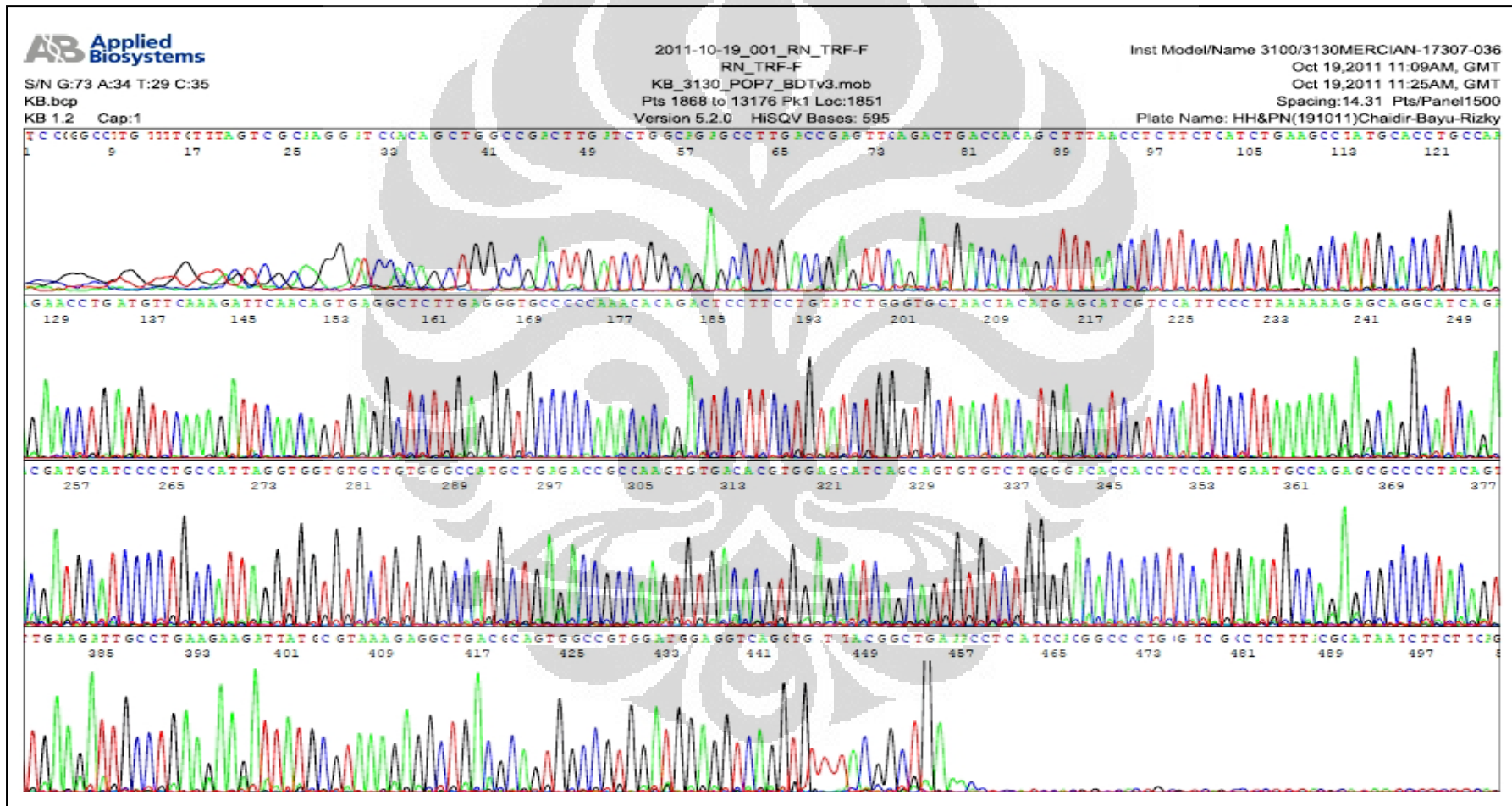
Lampiran 14

Hasil sekuensing gen transferin ikan nila *strain* GESIT



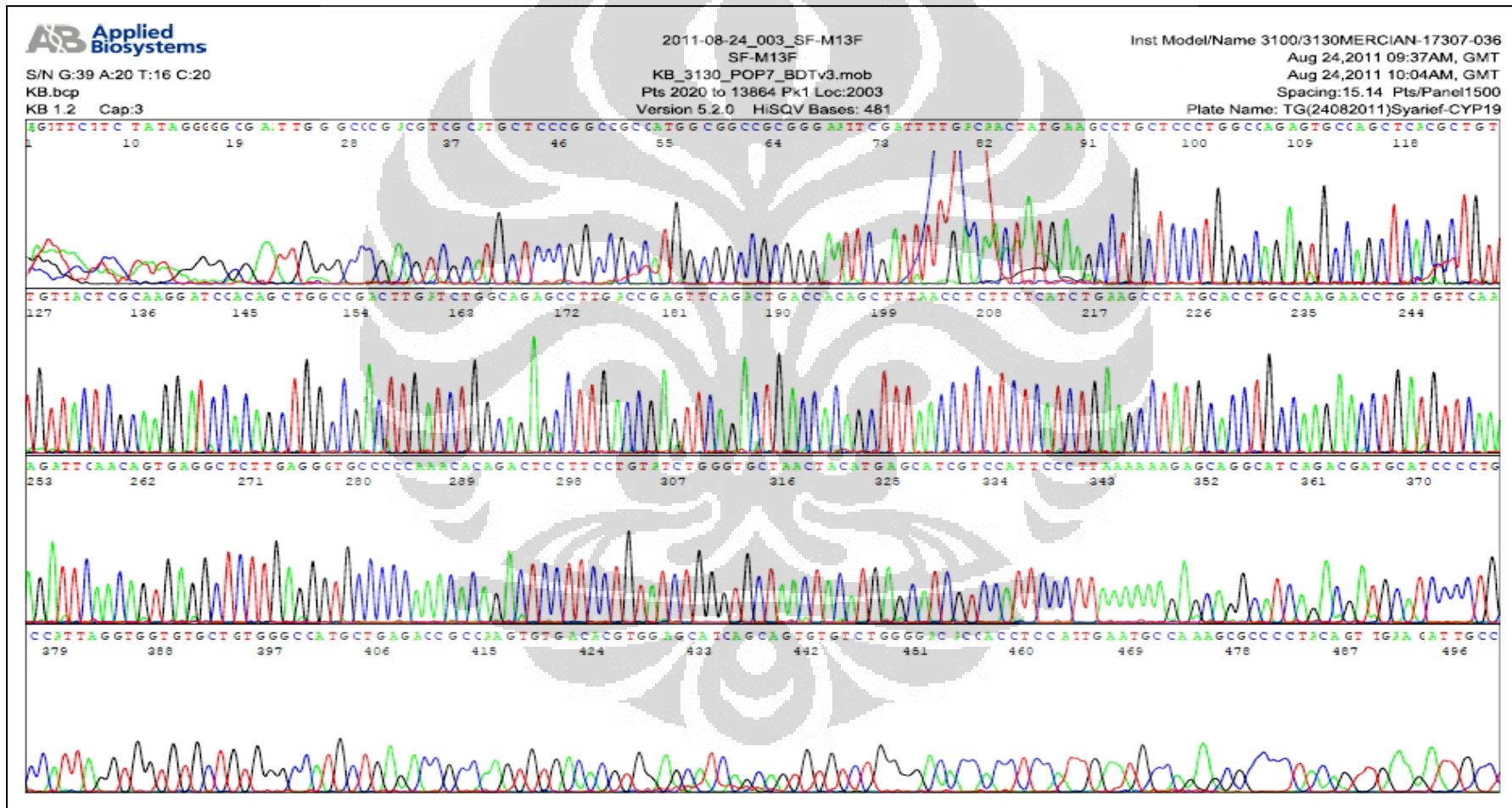
Lampiran 15

Hasil sekuensing gen transferin ikan nila *strain* Red Nifi



Lampiran 16

Hasil sekuensing gen transferin ikan nila *strain* Selfam



Universitas Indonesia

Lampiran 17
 Hasil *blastn* gen transferin ikan nila strain GESIT

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 1ZTA3H37016

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (561 letters)

Query ID: lc|59745
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 561

Database Name: nr
 Description: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Program: BLASTN 2.2.25+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 111 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query 1 100 200 300 400 500

<40 40-50 50-80 80-200 >=200

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AM709639.1	Pseudosciaena crocea mRNA for transferrin (tf gene)	339	339	84%	2e-89	80%	
AJ318861.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 1, exons 7-	294	872	86%	4e-76	100%	
AM419436.1	Trematomus bernacchii mRNA for transferrin (tf gene)	278	278	59%	4e-71	82%	
AM419435.1	Chaenocephalus aceratus mRNA for transferrin (tf gene)	276	276	81%	1e-70	78%	
DQ272465.1	Oreochromis niloticus transferrin (TRF) gene, complete cds	272	805	86%	2e-69	98%	
AM419437.1	Notothenia coriiceps mRNA for transferrin (tf gene)	263	263	81%	1e-66	78%	
AJ318862.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 2, exons 7-	263	811	86%	1e-66	99%	
AJ312311.1	Oreochromis mossambicus partial transferrin gene, exons 7-10	252	688	78%	2e-63	96%	
AM419434.1	Chionodraco rastrospinosus mRNA for transferrin (tf gene)	215	215	81%	3e-52	76%	
FM242727.1	Geoglobus sp. AF2T819 partial 16S rRNA gene, isolate AF2T819	124	124	12%	5e-25	98%	

Lampiran 18

Hasil *blastn* gen transferin ikan nila *strain* Red Nifi

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 9ZNFHDKH015

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (772 letters)

Query ID: ldl40235 Database Name: nr
 Description: None Description: All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Molecule type: nucleic acid Program: BLASTN 2.2.25+
 Query Length: 772

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 24 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XR_134747.1	PREDICTED: Oreochromis niloticus serotransferrin-like (LOC100691316)	715	1113	97%	0.0	95%	G
AM709639.1	Pseudosciaena crocea mRNA for transferrin (tf gene)	298	456	68%	4e-77	84%	
AJ318861.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 1, exons 7-	294	1017	78%	5e-76	98%	
AM419436.1	Trematomus bernacchii mRNA for transferrin (tf gene)	278	278	43%	5e-71	82%	
DQ272465.1	Oreochromis niloticus transferrin (TRF) gene, complete cds	272	771	63%	2e-69	98%	
AM419435.1	Chaenocephalus aceratus mRNA for transferrin (tf gene)	267	267	46%	1e-67	80%	
AJ318862.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 2, exons 7-	253	906	78%	1e-66	97%	
AJ312311.1	Oreochromis mossambicus partial transferrin gene, exons 7-10	252	699	63%	3e-63	96%	

Lampiran 19
 Hasil *blastn* gen transferin ikan nila *strain* Selfam

BLAST®
My NCBI [Sign In] [Register]

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - 5DWZX5RP01N

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (893 letters)

<p>Query ID lcl34815 Description None Molecule type nucleic acid Query Length 893</p> <p>Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results</p>	<p>Database Name nr Description All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Program BLASTN 2.2.25+ Citation</p>
---	---

▼ **Graphic Summary**

Distribution of 109 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

<40	40-50	50-80	80-200	>=200
-----	-------	-------	--------	-------

▼ **Descriptions**

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AJ318861.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 1, exons 7-	283	762	49%	1e-72	99%	
AM489733.1	Citrus reticulata microsatellite DNA, locus mCrCIR01B10, allele 01B10-	281	281	25%	5e-72	88%	
DQ272465.1	Oreochromis niloticus transferrin (TRF) gene, complete cds	268	783	54%	4e-68	98%	
AJ318862.1	Oreochromis aureus partial tf gene for transferrin, variant 2, exons 7-	263	706	49%	2e-66	98%	
AM419436.1	Trematomus bernacchii mRNA for transferrin (tf gene)	261	261	37%	6e-66	81%	
AM419435.1	Chaenocephalus aceratus mRNA for transferrin (tf gene)	259	259	50%	2e-65	78%	
AJ312311.1	Oreochromis mossambicus partial transferrin gene, exons 7-10	252	682	49%	4e-63	96%	
AM419437.1	Notothenia coriiceps mRNA for transferrin (tf gene)	246	246	51%	2e-61	77%	

Lampiran 20

Hasil *blastx* gen transferin ikan nila strain GESIT

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastx/ Formatting Results - 3F7R98F101N

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (561 letters)

Query ID: id|3127
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 561

Database Name: nr
 Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
 Program: BLASTX 2.2.25+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports

Graphic Summary

Distribution of 273 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query: 1 100 200 300 400 500

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CAC59953.1	transferrin [Oreochromis aureus]	317	317	86%	7e-110	96%	
CAC59954.1	transferrin [Oreochromis aureus]	311	311	88%	1e-107	92%	
CAC42228.1	transferrin [Oreochromis mossambicus]	294	294	86%	1e-100	89%	
ABB70391.1	transferrin [Oreochromis niloticus]	305	404	87%	4e-98	92%	
AEI16575.1	transferrin [Chelon labrosus]	242	242	84%	4e-79	75%	
NP_001116384.1	serotransferrin precursor [Oryzias latipes] >dbj BAF81983.1 transfer	253	358	87%	3e-78	76%	UG
P79819.1	RecName: Full=Serotransferrin; Flags: Precursor >dbj BAA10901.1 tr	251	356	87%	1e-77	75%	G
AAP94279.1	transferrin [Pagrus major]	242	340	86%	3e-74	73%	
CAM96032.1	transferrin [Larimichthys crocea]	241	339	86%	1e-73	73%	

Lampiran 21

Hasil *blastx* gen transferin ikan nila *strain* Red Nifi

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastx/Formatting Results - 9ZP3K6C201R

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (772 letters)

Query ID: Id|32101
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 772

Database Name: nr
 Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
 Program: BLASTX 2.2.25+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports

Graphic Summary

Distribution of 127 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Purple
>=200	Red

Query: 1 150 300 450 600 750

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CAC39933.1	transferrin [Oreochromis aureus]	190	190	52%	2e-58	91%	
CAC39954.1	transferrin [Oreochromis aureus]	181	181	52%	3e-55	88%	
ABR70391.1	transferrin [Oreochromis niloticus]	187	187	52%	3e-52	90%	
CAC42228.1	transferrin [Oreochromis mossambicus]	169	169	52%	2e-50	85%	
AEI16575.1	transferrin [Chelon labrosus]	150	218	89%	5e-42	85%	
NP_001116384.1	serotransferrin precursor [Oryzias latipes] >dbj BAF81983.1] transferrin	153	288	88%	1e-40	85%	UG
P79819.1	RecName: Full=Serotransferrin; Flags: Precursor >dbj BAA10901.1] trans	153	286	88%	6e-40	85%	G
AAP94279.1	transferrin [Pagrus major]	147	205	77%	7e-38	92%	

Lampiran 22

Hasil *blastx* gen transferin ikan nila *strain* Selfam

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help My NCBI [Sign In] [Registered]

NCBI/BLAST/blastx/Formatting Results - 5DXW85P601N

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (893 letters)

Query ID: lc|23643
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 893

Database Name: nr
 Description: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
 Program: BLASTX 2.2.25+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#)

Graphic Summary

Distribution of 243 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query: 1 150 300 450 600 750

<40 40-50 50-80 80-200 >=200

Descriptions

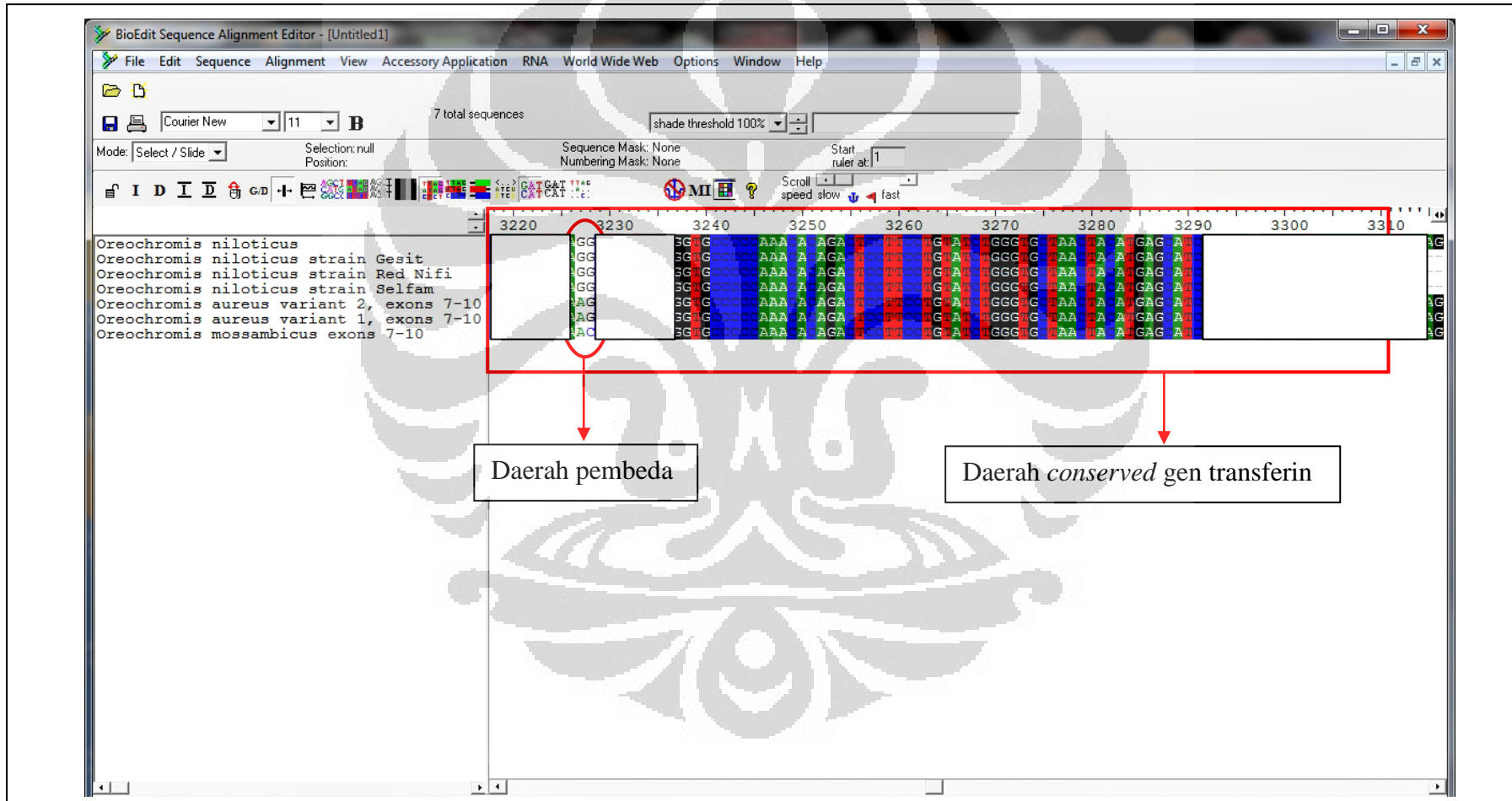
Legend for links to other resources: [UniGene](#) [GEO](#) [Gene](#) [Structure](#) [Map Viewer](#) [PubChem BioAssay](#)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CAC59953.1	transferrin [Oreochromis aureus]	307	307	54%	4e-104	93%	
CAC59954.1	transferrin [Oreochromis aureus]	300	300	54%	2e-101	90%	
CAC42228.1	transferrin [Oreochromis mossambicus]	287	287	54%	3e-96	88%	
ABB70391.1	transferrin [Oreochromis niloticus]	298	356	55%	1e-93	90%	
AE116575.1	transferrin [Chelon labrosus]	234	234	53%	6e-74	73%	
NP_001116384.1	serotransferrin precursor [Oryzias latipes] >dbj BAF81983.1 transfer	246	345	54%	7e-74	74%	UG
P79819.1	RecName: Full=Serotransferrin; Flags: Precursor >dbj BAA10901.1 tr	244	343	54%	4e-73	73%	G
AAP94279.1	transferrin [Pagrus major]	237	293	54%	2e-70	72%	

Lampiran 23

Hasil homologi gen transferin pada ikan nila



Lampiran 25

Hasil persentase GC, nilai *melting temperature* (T_m) dan struktur *hairpin* primer TrfNF

The screenshot shows the NetPrimer software interface. The 'Oligo' section contains the following information:

- Name: TrfNF
- Description: Primer forward gen transferin ikan nila
- Sequence: 5' [empty] 3' Length: 19 bp
- Oligo type: Sense Anti-sense

The 'Preferences' section shows the following settings:

- Nucleic Acid Conc: 250,0 pM
- Mono Ion Conc: 50,0 mM
- Free [Mg²⁺] Conc: 1,5 mM
- Total [Na⁺] Conc: 204,92 mM
- Temperature: 25,0 °C

The 'Results' section displays the following data:

- Rating: 100,0
- Molecular Wt: 5939,92
- T_m : 54,38 °C
- GC %: 57,89
- nmol/A₂₆₀: 5,34

The 'Results' section also shows thermodynamic values:

- $\mu g/A_{260}$: 31,75
- ΔG : -31,05 kcal/mol
- 3' end Stability: -9,43 kcal/mol
- ΔH : -139,4 kcal/mol
- ΔS : -0,36 Kcal°K/mol
- 5' end ΔG : -6,47 kcal/mol

The interface includes buttons for 'Restore Default', 'Analyze', 'Print', and 'Help'. Below these are options for 'Hairpin', 'Dimer', 'Cross Dimer', 'Palindrome', and 'Repeat & Run'. The 'Total Found = 0' is displayed, and a message box shows 'Hairpins not found'.

Lampiran 26

Hasil persentase GC, nilai *melting temperature* (T_m) dan struktur *hairpin* primer TrfNR

The screenshot displays the NetPrimer software interface for primer analysis. The 'Oligo' section shows the name 'TrfNR', description 'Primer reverse gen transferin ikan nila', and a 3' length of 18 bp. The 'Oligo type' is set to 'Anti-sense'. The 'Preferences' section includes settings for Nucleic Acid Conc (250,0 pM), Mono Ion Conc (50,0 mM), Free [Mg2+] Conc (1,5 mM), Total [Na+] Conc (204,92 mM), and Temperature (25,0 °C). The 'Results' section shows a Rating of 100,0, Molecular Wt of 5612,73, T_m of 53,53 °C, GC % of 50,0, and nmol/A₂₆₀ of 5,37. The 'Results' section also shows thermodynamic values: ΔG (30,13 kcal/mol), 3' end Stability (-8,14 kcal/mol), ΔH (-140,1 kcal/mol), ΔS (-0,37 Kcal/K/mol), and 5' end ΔG (-7,57 kcal/mol). The 'Hairpin' section shows 'Total Found = 0' and a message 'Hairpins not found'.

Parameter	Value	Unit
Rating	100,0	
Molecular Wt	5612,73	
T_m	53,53	°C
GC %	50,0	
nmol/A ₂₆₀	5,37	
ΔG	30,13	kcal/mol
3' end Stability	-8,14	kcal/mol
ΔH	-140,1	kcal/mol
ΔS	-0,37	Kcal/K/mol
5' end ΔG	-7,57	kcal/mol

Lampiran 27
Hasil uji struktur *dimer* primer TrfNF

NetPrimer

Oligo

Name: TrfNF

Description: Primer forward gen transferin ikan nila

Sequence: 5' [] 3' Length: 19 bp

Oligo type

Sense Anti-sense

Preferences

Nucleic Acid Conc:	250,0	pM
Mono Ion Conc:	50,0	mM
Free [Mg ²⁺] Conc:	1,5	mM
Total [Na ⁺] Conc:	204,92	mM
Temperature:	25,0	°C

Results

Rating:	100,0
Molecular Wt:	5939,92
T _m :	54,38 °C
GC %:	57,89
nmol/A ₂₆₀ :	5,34

Results

µg/A ₂₆₀ :	31,75
ΔG:	-31,05 kcal/mol
3' end Stability:	-9,43 kcal/mol
ΔH:	-139,4 kcal/mol
ΔS:	-0,36 Kcal°K/mol
5' end ΔG:	-6,47 kcal/mol

Restore Default Analyze Print Help

Hairpin Dimer Cross Dimer Palindrome Repeat & Run

Total Found = 0 All

Dimers not found

Lampiran 28
Hasil uji struktur *dimer primer* TrfNR

NetPrimer

Oligo

Name: TrfNR

Description: Primer reverse gen transferin ikan nila

Sequence: 5' 3' Length: 18 bp

Oligo type

Sense Anti-sense

Preferences

Nucleic Acid Conc:	250,0	pM
Mono Ion Conc:	50,0	mM
Free [Mg ²⁺] Conc:	1,5	mM
Total [Na ⁺] Conc:	204,92	mM
Temperature:	25,0	°C

Results

Rating:	100,0
Molecular Wt:	5612,73
T _m :	53,53 °C
GC %:	50,0
nmol/A ₂₆₀ :	5,37

Results

µg/A ₂₆₀ :	30,13
ΔG:	-30,83 kcal/mol
3' end Stability:	-8,14 kcal/mol
ΔH:	-140,1 kcal/mol
ΔS:	-0,37 Kcal*/K/mol
5' end ΔG:	-7,57 kcal/mol

Restore Default Analyze Print Help

Hairpin Dimer Cross Dimer Palindrome Repeat & Run

Total Found = 0 All

Dimers not found

Lampiran 29

Hasil uji struktur *cross dimer* primer TrfNF dan primer TrfNR

The screenshot displays the NetPrimer software interface. The 'Oligo' section shows a 19 bp sequence. The 'Preferences' section includes Nucleic Acid Conc (250,0 pM), Mono Ion Conc (50,0 mM), Free [Mg²⁺] Conc (1,5 mM), Total [Na⁺] Conc (204,92 mM), and Temperature (25,0 °C). The 'Results' section shows Rating (100,0), Molecular Wt (5939,92), T_m (54,38 °C), GC % (57,89), and nmol/A₂₆₀ (5,34). The 'Results' table shows:

Parameter	Value	Unit
µg/A ₂₆₀	31,75	
ΔG	-31,05	kcal/mol
3' end Stability	-9,43	kcal/mol
ΔH	-139,4	kcal/mol
ΔS	-0,36	Kcal/K/mol
5' end ΔG	-6,47	kcal/mol

The 'Cross Dimer' analysis shows 'Total Found = 0' and 'Cross Dimers not found'.

Lampiran 30
Hasil uji struktur *palindrome* primer TrfNF

The screenshot shows the NetPrimer software interface. The 'Oligo' section contains the following information:

- Name: TrfNF
- Description: Primer forward gen transferin ikan nila
- Sequence: 5' [] 3' Length: 19 bp

The 'Oligo type' section has 'Sense' selected.

The 'Preferences' section includes:

- Nucleic Acid Conc: 250,0 pM
- Mono Ion Conc: 50,0 mM
- Free [Mg2+] Conc: 1,5 mM
- Total [Na+] Conc: 204,92 mM
- Temperature: 25,0 °C

The 'Results' section displays:

- Rating: 100,0
- Molecular Wt: 5939,92
- T_m: 54,38 °C
- GC %: 57,89
- nmol/A₂₆₀: 5,34

The 'Results' table shows:

Parameter	Value	Unit
µg/A ₂₆₀	31,75	
ΔG	-31,05	kcal/mol
3' end Stability	-9,43	kcal/mol
ΔH	-139,4	kcal/mol
ΔS	-0,36	Kcal/°K/mol
5' end ΔG	-6,47	kcal/mol

The 'Palindromes not found' message is displayed in a red-bordered box at the bottom of the interface.

Lampiran 31
Hasil uji struktur *palindrome* primer TrfNR

The screenshot shows the NetPrimer software interface. The 'Oligo' section contains the following information:

- Name: TrfNR
- Description: Primer reverse gen transferin ikan nila
- Sequence: 5' [] 3' Length: 18 bp

The 'Oligo type' section has 'Anti-sense' selected.

The 'Preferences' section includes:

- Nucleic Acid Conc: 250,0 pM
- Mono Ion Conc: 50,0 mM
- Free [Mg2+] Conc: 1,5 mM
- Total [Na+] Conc: 204,92 mM
- Temperature: 25,0 °C

The 'Results' section displays the following data:

Rating:	100,0
Molecular Wt:	5612,73
T _m :	53,53 °C
GC %:	50,0
nmol/A ₂₆₀ :	5,37

The 'Results' section also includes a table of thermodynamic values:

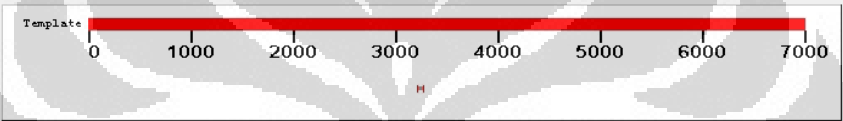
μg/A ₂₆₀ :	30,13
ΔG:	-30,83 kcal/mol
3' end Stability:	-8,14 kcal/mol
ΔH:	-140,1 kcal/mol
ΔS:	-0,37 Kcal/°K/mol
5' end ΔG:	-7,57 kcal/mol

The 'Palindromes not found' message is highlighted with a red box in the results area.

Lampiran 32
 Hasil *primer BLAST*

Other reports [STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences\) ...help on specific primers](#)
[Search Summary](#)

▼ **Summary of primer pairs**



▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		Plus	19	3219	3237	52.77	57.89	5.00	0.00
Reverse primer		Minus	18	3301	3284	48.31	50.00	3.00	3.00
Product length	83								

Products on potentially unintended templates

>[DQ272465.1](#) Oreochromis niloticus transferrin (TRF) gene, complete cds

product length = 83

Forward primer	1		19
Template	3219		3237
Reverse primer	1		18
Template	3301		3284

>[AJ312311.1](#) Oreochromis mossambicus partial transferrin gene, exons 7-10

product length = 83

Forward primer	1		19
Template	301		319
Reverse primer	1		18
Template	383		366