



UNIVERSITAS INDONESIA

**KLONING DAN EKSPRESI GEN *tilapia Growth Hormone (tiGH)*
UNTUK MEMPRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN
HORMON PERTUMBUHAN IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)**

SKRIPSI

**MUHAMMAD TAUFIQ SOEKARNO
0706264034**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**KLONING DAN EKSPRESI GEN *tilapia Growth Hormone (tiGH)*
UNTUK MEMPRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN
HORMON PERTUMBUHAN IKAN NILA
(*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**MUHAMMAD TAUFIQ SOEKARNO
0706264034**

**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 : Muhammad Taufiq Soekarno

NPM : 0706264034

Tanda Tangan :



Tanggal : 29 Desember 2011

HALAMAN PENGESAHAN

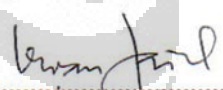
Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Muhammad Taufiq Soekarno
NPM : 0706264034
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Kloning dan Ekspresi gen *tilapia growth hormone (tiGH)* untuk Memproduksi Protein Rekombinan Hormon Pertumbuhan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)

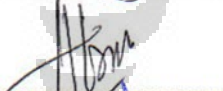
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI


Pembimbing I : Dr. Irvan Faizal, M.Eng

(
.....)

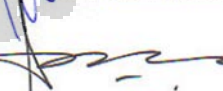
Pembimbing II : Dr. Abinawanto

(
.....)

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 hanya kepada Allah SWT atas semua nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, Sang Rahmat bagi semesta alam. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI). Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Irvan Faizal, M.Eng dan Dr. Abinawanto selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, semangat, dan saran sehingga penulis dapat menuntaskan skripsi.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dr. Anom Bowolaksono selaku Penguji I dan II, serta Dra. Lestari Rahayu K. M. Sc selaku ketua sidang atas segala saran dan perbaikan-perbaikan, dukungan, dan doa yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi.
3. Dra. Setiorini, M.Kes selaku Pembimbing Akademis atas segala saran-saran bimbingannya, serta motivasi yang selalu diberikan.
4. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI.
5. Segenap staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi FMIPA UI. Terima kasih pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.
6. Ir. Nenie Yustiningsih, M. Sc, selaku Direktur Teknologi Produksi Pertanian BPPT yang telah memberikan izin kepada Penulis untuk melakukan

penelitian. Terima kasih juga kepada Dr. Sachoemar I. Suhendar, Dr. Siti Ratu Aliyah, Dr. Husni Amarullah, dan Ir. Doddy Irawan, M. Sc, selaku staf Laboratorium Bioakuakultur PTPP-BPPT yang telah memberikan sambutan hangat dan dukungan kepada Penulis

7. Segenap staf laboratorium Bioakuakultur PTPP, Mbak Novi, Mbak Tanti, Mbak Kiki, Mas Denny, Mas Yogi, Mas Bagus, Pak Wisnu, Om Rizki, Om Rahmat dan Pak Ayub juga teman-teman seperjuangan Ibel, Ika, Nadia, Heidy atas bantuan dalam mendapatkan data, ilmu, dan keceriaan yang diberikan selama penelitian.
8. Keluarga tercinta, Mama (Dra. Siti Nurdjanah. K), Ayah (Drs. Karno) dan Kakak (Muhammad Syarifudin Soekarno) atas dukungan, semangat, nasihat, serta doa yang selalu diberikan kepada penulis.
9. Fajar muhamad, Putsan, Gitaw, Tewe, Tami atas saran dan diskusinya yang diberikan kepada penulis.
10. Untuk rekan tim satu penelitian Bayu dan Kimbod serta untuk Eja, Maridha, Iik, Fika, Tiwie, Indah, Bibil, Januar, anak-anak Amin-Abbas, dan seluruh teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, serta untuk teman-teman BLOSSOM 07. Terima kasih juga buat kakak-kakak Baliveau04, Biosphere05, Felix 06 adik-adik Biosentris 08 dan Zygomorphic 09.

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

29 Desember 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Muhammad Taufiq Soekarno
NPM : 0706264034
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:

Kloning dan Ekspresi Gen *tilapia Growth Hormone (tiGH)* untuk Memproduksi Protein Rekombinan Hormon Pertumbuhan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan karya ilmiah 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



(Muhammad Taufiq Soekarno)

ABSTRAK

Nama : Muhammad Taufiq Soekarno
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Kloning dan Ekspresi Gen *tilapia Growth Hormone (tiGH)*
untuk Memproduksi Protein Rekombinan Hormon Pertumbuhan
Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758)

Gen *tilapia Growth Hormone (tiGH)* merupakan gen pengkode hormon pertumbuhan dari ikan nila yang berperan untuk meningkatkan pertumbuhan. Penelitian bertujuan melakukan kloning dan ekspresi gen *tiGH* untuk memproduksi protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Penelitian meliputi tahapan isolasi gen *tiGH* dari pMBA_*tiGH*, ligasi ke dalam pETBlue-2, serta transformasi vektor rekombinan ke dalam sel inang dengan menggunakan elektroporasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vektor rekombinan dapat ditransformasi ke dalam sel inang *E. coli* BL2 dengan efisiensi transformasi $1,12 \times 10^3$ cfu/ μ g. Ekspresi gen *tiGH* dilakukan menggunakan induksi IPTG 0,4 mM dan dipurifikasi menjadi protein rekombinan *growth hormone* dengan berat molekul sebesar 22 kDa.

Kata kunci : *E.coli* BL21, gen *tiGH*, hormon pertumbuhan, kloning, pETBlue-2

xi + 64 hlm; 25 gambar, 1 tabel
Daftar Referensi : 52 (1985--2011)

ABSTRACT

Name : Muhammad Taufiq Soekarno
Study Program : Biology S1 Regular
Title : Cloning and Expression of *tilapia Growth Hormone Gene (tiGH)* for Producing Recombinant Protein of Tilapia Growth Hormone (*Oreochromis niloticus*, Linneaus 1758)

Tilapia growth hormone gene (*tiGH*) is a gene encoding growth hormone from the tilapia whose folr is to increase the growth. The research objective is to do cloning and expression *tiGH* gene to produce growth hormone recombinant proteins of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Stages of research include isolation *tiGH* gene from pMBA_*tiGH*, ligation into pETBlue-2, and the transformation recombinant vector into host cells by using electroporation. The result showed that recombinant vectors have been successfully transformed into the host cell *E.coli* BL21 with transformation efficiency reached 1.12×10^3 cfu/ μ g. Expression *tiGH* gene performed using 0.4 mM IPTG induction and purified recombinant protein growth hormone with a molecular weight of 22 kDa.

Keywords : Cloning, *E.coli* BL21, Growth hormone, pETBlue-2, *tiGH* gene,

xi + 64 pages; 25 pictures, 1 table
Bibliography : 52 (1985--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>)	4
2.2 Hormon Pertumbuhan	5
2.3 Kloning.....	7
2.3.1 Komponen kloning	7
2.3.1.1 Sampel DNA	7
2.3.1.2 Vektor	7
2.3.1.3 Enzim restriksi	9
2.3.1.4 Ligasi	10
2.3.1.5 Sel inang	10
2.3.2 Tahapan tahapan proses kloning	11
2.3.2.1 Pemilihan sampel DNA	11
2.3.2.2 Penyisipan DNA ke dalam vektor	12
2.3.2.3 Transformasi vektor rekombinan ke dalam sel inang.....	12
2.3.2.4 <i>Screening</i>	13
2.4 Ekspresi pada Sel Prokariotik	14
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16
2.6 <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE)</i>	17
3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Lokasi dan Waktu penelitian	20
3.2 Sampel	20
3.3 Bahan	20
3.3.1 Bahan habis pakai	20
3.3.2 Bahan kimia	20
3.4 Peralatan	21
3.5 Skema kerja penelitian	22
3.6 Cara kerja	23

3.6.1	Pembuatan larutan dan <i>buffer</i>	23
3.6.2	Isolasi gen <i>tiGH</i>	23
3.6.3	Pemisahan fragmen DNA dengan elektroforesis gel agarosa ...	23
3.6.4	Ekstraksi dan purifikasi gel DNA gel elektroforesis	24
3.6.5	Ligasi gen <i>tiGH</i> dan vektor ekspresi pETBlue-2	24
3.6.6	Pembuatan sel kompoten <i>E. coli</i> novablue dan <i>E. coli</i> BL21...	25
3.6.7	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> novablue	25
3.6.8	Isolasi plasmid	26
3.6.9	Verifikasi hasil isolasi plasmid	27
3.6.10	Verifikasi vektor rekombinan dengan menggunakan enzim restriksi <i>EcoRI</i>	27
3.6.11	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	27
3.6.12	Verifikasi hasil Transforman dengan PCR	28
3.6.13	Ekspresi gen <i>tiGH</i> dengan induksi IPTG	28
3.6.14	Purifikasi protein rekombinan <i>tiGH</i>	30
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Hasil	31
4.1.1	Isolasi gen <i>tiGH</i>	31
4.1.2	Ligasi DNA <i>insert</i> dengan vektor ekspresi pETBlue-2	33
4.1.3	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> novablue	33
4.1.4	Isolasi plasmid hasil transformasi	34
4.1.5	Pengukuran kemurnian dan konsentrasi vektor rekombinan	35
4.1.6	Verifikasi hasil isolasi plasmid dengan PCR.....	35
4.1.7	Verifikasi dengan digesti	37
4.1.8	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	38
4.1.9	Verifikasi hasil transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	39
4.1.10	Ekspresi protein rekombinan <i>tiGH</i>	40
4.1.11	Purifikasi protein rekombinan <i>tiGH</i>	41
4.2	Pembahasan.....	42
4.2.1	Isolasi gen <i>tiGH</i>	42
4.2.2	Ligasi DNA <i>insert</i> dengan vektor ekspresi pETBlue-2	42
4.2.3	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> novablue	43
4.2.4	Isolasi plasmid hasil transformasi	44
4.2.5	Pengukuran kemurnian dan konsentrasi vektor rekombinan	44
4.2.6	Verifikasi hasil isolasi plasmid dengan PCR.....	45
4.2.7	Verifikasi dengan digesti	48
4.2.8	Transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	48
4.2.9	Verifikasi hasil transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	49
4.2.10	Ekspresi protein rekombinan <i>tiGH</i>	49
4.2.11	Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan <i>tiGH</i> secara manual dari hasil SDS PAGE	50
4.2.12	Purifikasi protein rekombinan <i>tiGH</i>	51
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1	Kesimpulan	53
5.2	Saran	53
	DAFTAR REFERENSI.....	54

DAFTAR GAMBAR

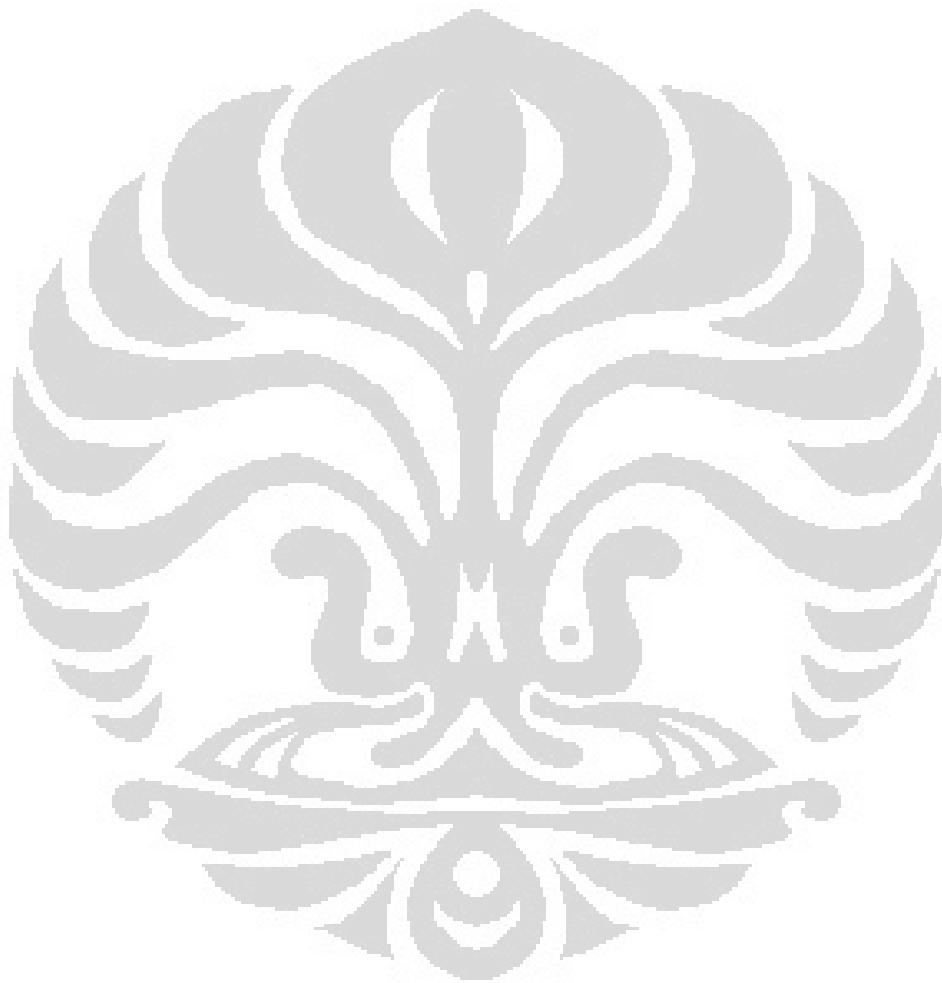
Gambar 2.1	Ikan nila (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	5
Gambar 2.2	Konstruksi pMBA_ <i>tiGH</i>	6
Gambar 2.3.1.2	Peta vektor ekspresi pETBlue-2.....	9
Gambar 2.3.2	Tahapan-tahapan kloning	12
Gambar 2.4(1)	Struktur Gen dalam <i>operon lac</i>	15
Gambar 2.4(2)	Mekanisme ekspresi bakteri dengan induksi IPTG.....	16
Gambar 2.5	Siklus PCR	17
Gambar 2.6	Mini-PROTEAN Tetra Cell	18
Gambar 3.5	Skema kerja penelitian	22
Gambar 4.1.1(1)	Visualisasi hasil isolasi gen <i>tiGH</i> dari vektor pMBA	31
Gambar 4.1.1(2)	Visualisasi hasil purifikasi DNA <i>insert tiGH</i>	32
Gambar 4.1.3	Hasil transformasi ke dalam <i>E. coli</i> novablue.....	33
Gambar 4.1.4(1)	<i>Streak</i> ulang koloni hasil transformasi	34
Gambar 4.1.4(2)	Visualisasi hasil isolasi plasmid.....	34
Gambar 4.1.6(1)	Visualisasi hasil PCR <i>insert tiGH</i>	36
Gambar 4.1.6(2)	Visualisasi hasil PCR orientasi <i>insert tiGH</i>	36
Gambar 4.1.7	Visualisasi hasil digesti	37
Gambar 4.1.8(1)	Hasil transformasi <i>E. coli</i> BL21	38
Gambar 4.1.8(2)	Hasil <i>streak</i> ulang transformasi <i>E. coli</i> BL21	39
Gambar 4.1.9	Visualisasi hasil <i>insert tiGH</i> dengan PCR koloni	39
Gambar 4.1.10	Visualisasi SDS PAGE protein rekombinan <i>tiGH</i>	40
Gambar 4.1.11	Visualisasi purifikasi protein rekombinan <i>tiGH</i>	41
Gambar 4.2.6(1)	Pelekatan primer pETBlueUP dan pETBlueDOWN	45
Gambar 4.2.6(2)	Skema orientasi <i>insert tiGH</i> terhadap vektor	47
Gambar 4.2.11	Kurva standar berat molekul marka protein	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.5	Pengukuran konsentrasi dan kemurnian vektor rekombinan.....	35
-------------	---	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi dan cara pembuatan larutan/ <i>buffer</i>	59
Lampiran 2.	Komposisi reaksi digesti menggunakan <i>EcoRI</i>	61
Lampiran 3.	Komposisi reaksi ligasi pETBlue-2 dan <i>tiGH</i>	61
Lampiran 4.	Komposisi larutan dalam isolasi plasmid	61
Lampiran 5.	Primer yang digunakan dalam penelitian.....	62
Lampiran 6.	Komposisi reaksi PCR untuk verifikasi <i>insert tiGH</i>	62
Lampiran 7.	Program PCR untuk verifikasi <i>insert</i> dan orientasi.....	63
Lampiran 8.	Komposisi dan volume reaksi yang digunakan dalam pembuatan gel Poliakrilamid	63
Lampiran 9.	Perhitungan efisiensi transformasi ke dalam <i>E. coli</i> BL21.....	64
Lampiran 10.	Perhitungan berat molekul protein rekombinan <i>Growth hormone</i> hasil SDS PAGE	65



BAB 1 PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang luas dengan wilayah daerah perairan meliputi dua pertiga luas wilayah Indonesia. Wilayah perairan tersebut terdiri atas perairan air tawar, air laut dan air payau. Potensi alam tersebut dapat menjadikan sektor perikanan menjadi salah satu sektor agribisnis yang dapat dikembangkan di Indonesia. Hasil perikanan air tawar yang banyak dibudidayakan di Indonesia di antaranya ikan gurami, ikan nila, ikan mas, dan ikan patin. Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu ikan yang banyak diminati untuk dibudidayakan karena memiliki tekstur daging yang lembut, masa memijah relatif cepat dan memiliki kandungan protein yang tinggi. (Prihatman 2000: 2--3).

Keunggulan ikan nila tersebut menyebabkan ikan nila banyak di konsumsi. Ikan nila banyak diminati di berbagai negara di antaranya Amerika, Singapura, Jepang dan Uni Eropa (Rukmana 2007: 18). Menurut KKP (2011: 1) produksi ikan nila tahun 2011 ditargetkan sebesar 639.300 ton. Nilai tersebut meningkat sebesar 36,26 % dibandingkan tahun 2010 yang sebesar 469.173 ton. Untuk meningkatkan produksi ikan nila diperlukan cara untuk meningkatkan produksi ikan nila. Produksi ikan nila yang meningkat pada akhirnya dapat meningkatkan industri agribisnis ikan nila.

Salah satu metode yang dapat diterapkan untuk meningkatkan produksi ikan nila adalah dengan menggunakan protein rekombinan dari hormon pertumbuhan. Protein rekombinan adalah suatu protein yang dikode oleh urutan DNA yang telah mengalami rekombinasi. Rekombinasi DNA adalah penggabungan segmen-segmen DNA target dengan DNA vektor, dalam hal ini adalah plasmid yang terdapat di dalam bakteri dalam jumlah yang jauh lebih besar (Campbell *dkk.* 2002: 398). Alasan penggunaan protein rekombinan adalah protein tersebut bersifat instan karena diproduksi di bantu oleh bakteri. Protein yang dihasilkan dapat dicampurkan dalam *pellet* makanan ikan sehingga penggunaannya lebih aplikatif di dalam usaha budidaya ikan. Alasan lain adalah pembuatan protein rekombinan tersebut dapat dibuat dalam skala besar dan dalam

waktu yang singkat. Penggunaan hormon pertumbuhan dapat mempercepat pertumbuhan ikan.

Penelitian-penelitian terdahulu yang membuktikan bahwa protein rekombinan dapat meningkatkan pertumbuhan ikan telah banyak dilakukan diantaranya dilakukan oleh Tsai *dkk* (1995: 4119) melaporkan bahwa pada *juvenile* ikan *Mugil cephalu*, dengan penyuntikan 0,1 µg dari *recombinant Growth Hormone* (rGH) per gram berat badan, dapat meningkatkan berat ikan *Mugil cephalu* menjadi 65% setelah 2 minggu penyuntikan. Acosta *dkk* (2007: 1672) juga melaporkan dengan perendaman 0,1mg protein rekombinan tiGH per liter selama 90 menit tanpa resirkulasi air menghasilkan pertumbuhan pada *juvenile* ikan nila merah sebesar 171% setelah 6 minggu.

Hormon pertumbuhan ikan nila dapat diproduksi dengan menggunakan teknologi protein rekombinan menggunakan bantuan bakteri seperti *Escherichia coli*. Salah satu pendekatan yang paling penting untuk memaksimalkan produksi protein rekombinan adalah desain vektor dan pemilihan inang ekspresi yang ideal. Vektor ekspresi didesain untuk menghasilkan produk protein dari gen yang diklonakan (Weaver 2002 : 82). Vektor pET merupakan salah satu contoh vektor ekspresi (Novagen 2004: 6). Vektor pET mempunyai kemampuan dalam menghasilkan protein dalam skala besar dengan melibatkan promoter T7. Salah satu contoh vektor pET di antaranya adalah pETBlue-2. Vektor pET didesain untuk meningkatkan dan mempermudah kloning, deteksi, dan pemurnian protein target.

Gen *tilapia Growth Hormone* (*tiGH*) telah berhasil diisolasi oleh Rentier-Dulue *dkk* (1993: 273). Berdasarkan sekuen tersebut dilakukan konstruksi oleh Kobayashi *dkk.* (2007: 430). Penggunaan vektor ekspresi pETBlue-2 dalam membawa gen *tiGH* hingga akhirnya ditransformasi dan diekspresikan ke dalam sel inang *E coli* BL21 sebagai dasar pembuatan protein rekombinan hormon pertumbuhan belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian kloning dan ekspresi gen *tiGH* untuk memproduksi protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan nila. Penelitian bertujuan untuk melakukan kloning dan mengekspresikan gen *tiGH* untuk memproduksi protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan nila. Hipotesis penelitian adalah gen *tiGH* dapat dikloning ke

dalam vektor ekspresi pETBlue-2 dan vektor rekombinan dapat ditransformasi ke dalam *E. coli* BL21 dan dapat mengekspresikan menjadi protein rekombinan hormon pertumbuhan ikan nila.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Menurut ITIS (2011: 1), ikan nila diklasifikasikan sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: Animalia
<i>Phylum</i>	: Chordata
<i>Class</i>	: Actinopterygii
<i>Ordo</i>	: Perciformes
<i>Family</i>	: Cichlidae
<i>Genus</i>	: <i>Oreochromis</i>
<i>Species</i>	: <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)

Ikan nila secara alami bermigrasi dari habitat aslinya menuju bagian hulu Sungai Nil, Afrika tengah dan barat. Namun dengan campur tangan manusia, persebaran ikan nila telah menyebar keseluruh dunia (Amri & Khairuman 2008: 17). Ikan nila memiliki nama latin *Tilapia nilotica* atau ikan dari golongan *Tilapia* yang tidak mengerami telur dan larva di dalam mulut kedua induknya. Namun setelah diketahui bahwa yang mengerami telur dan larva ikan nila di dalam mulut hanya induk betinanya maka ikan nila dikelompokkan ke dalam genus dari *Oreochromis* (Kordi 2010: 24)

Ikan nila memiliki bentuk tubuh memanjang dan pipih ke samping, warna sisik umumnya putih kehitaman dan semakin terang ke arah ventral. Ikan nila mempunyai garis vertikal 9 -- 11 buah berwarna hijau kebiruan. Mata ikan nila tampak menonjol dengan bagian tepi berwarna hijau kebiru-biruan. Mulut terletak di bagian terminal (Gambar 2.1) (Amri & Khairuman 2008: 21-22).



Gambar 2.1 Ikan nila (*Oreochromis niloticus*)

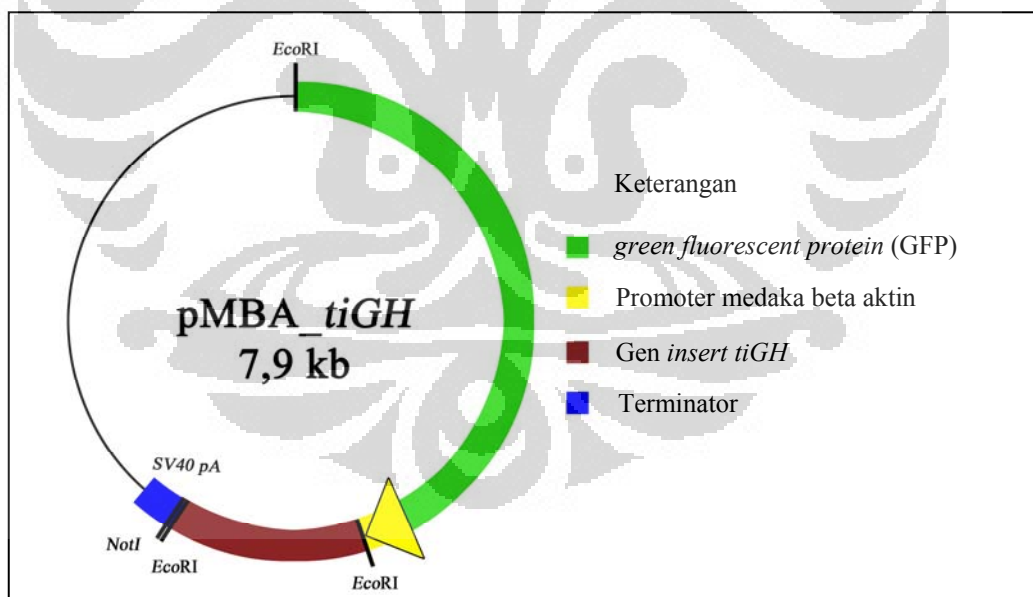
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

2.2 Hormon Pertumbuhan

Hormon merupakan bahan kimia pembawa sinyal yang dibentuk dalam sel-sel khusus pada kelenjar endokrin. Hormon disekresikan ke dalam darah kemudian disalurkan ke organ-organ yang menjalankan fungsi-fungsi regulasi tertentu secara fisiologi dan biokimia. Hormon pertumbuhan merupakan salah satu jenis hormon (Matty 1985: 200). Hormon pertumbuhan merupakan hormon polipeptida yang dilepaskan dari adenohipofisa yang menginduksi hati agar mensintesis somatomedin yang berperan langsung dalam pertumbuhan, baik pertumbuhan tulang, otot maupun sel-sel lain. Hormon pertumbuhan mampu meningkatkan nafsu makan, konversi pakan, sintesis protein, menurunkan ekskresi nitrogen, merangsang metabolisme dan oksidasi lemak, serta memacu sintesis dan pelepasan insulin. Selain itu, hormon pertumbuhan juga memengaruhi reproduksi dan osmoregulasi (Li *dkk.* 2005: 76). Hormon pertumbuhan berdasarkan mekanisme kerja, dapat dibagi menjadi dua yaitu mekanisme langsung dan tak langsung. Mekanisme langsung adalah mekanisme pengikatan hormon pertumbuhan dengan reseptor pada sel target misalnya sel adiposit. Interaksi hormon pertumbuhan dan reseptor akan mengakibatkan pemecahan trigliserida. Mekanisme tak langsung adalah mekanisme dengan perantara *insulin like growth factor-I* (IGF- I). IGF-I adalah hormon yang disekresikan oleh hati akibat adanya hormon pertumbuhan. IGF-I akan

merangsang diferensiasi miogenik dan merangsang proliferasi dan diferensiasi sel otot dan tulang (Matty 1985: 260).

Gen hormon pertumbuhan pada ikan telah banyak diketahui di antaranya gen hormon pertumbuhan tilapia, tuna dan *yellowfin porgy*. Gen hormon Ikan tilapia berhasil diisolasi oleh Rentier-Dulue *dkk* (1993: 273) . Berdasarkan sekuen tersebut dilakukan konstruksi (Kobayashi *dkk.* 2007: 430). Metode yang digunakan untuk mendapatkan cDNA *tiGH* adalah ekstraksi RNA, kemudian di cDNA dengan menggunakan *reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Hasil PCR produk di kloning di dalam pGEM T-Easy *vector* dan di potong menggunakan enzim *ApaI* dan *NotI*. Vektor pEGFP, yang membawa *green fluorescent protein* (GFP) yang di bawa oleh promoter medaka beta aktin. Vektor tersebut dipotong menggunakan enzim yang *ApaI* dan *NotI*, sehingga menyebabkan bagian GFP terpotong. Kemudian cDNA *tiGH* di sisipkan diantara promoter medaka beta aktin dan SV40 poly (A). Konstruksi tersebut disebut pMBA*tiGH* (medaka beta aktin *tilapia Growth Hormone*) dengan ukuran sebesar 7,9 kb (Gambar 2.2) (Kobayashi *dkk.* 2007: 430).



Gambar 2.2 Konstruksi pMBA_ *tiGH*
[Sumber: Kobayashi. *Dkk* 2007: 429. Telah diolah kembali]

2.3 Kloning

Kloning 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 dikloning ke dalam sel inang. Vektor rekombinan yang ditransformasi ke dalam sel inang ikut membelah setiap sel inang melakukan pembelahan sehingga koloni sel inang yang membawa vektor dengan gen target akan menghasilkan salinan gen target yang banyak (Wong 1997: 4).

2.3.1 Komponen kloning

2.3.1.1 Sampel DNA

Sampel DNA yang digunakan untuk dikloning dapat berupa DNA genom atau DNA komplementer yang merupakan DNA komplemen dari mRNA (Snustad & Simmons 2003: 486). Sampel DNA dapat juga berasal dari hasil isolasi DNA yang dimanipulasi lebih lanjut dengan prosedur subkloning, produk PCR, atau oligonukleotida yang disintesis secara kimiawi (Twyman 1998: 325).

2.3.1.2 Vektor

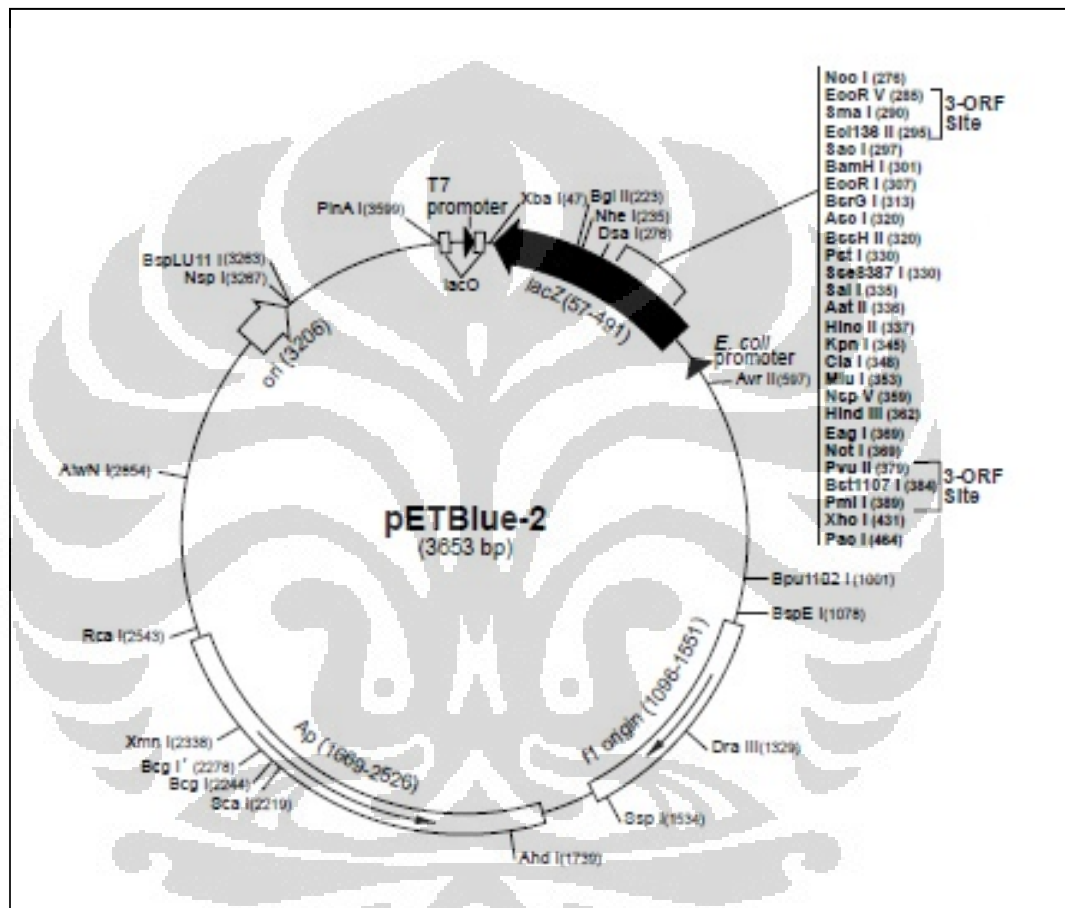
Vektor adalah molekul DNA yang dapat membawa DNA asing ke dalam sel inang dan bereplikasi di dalam sel inang (Campbell *dkk.* 2002: 392). Molekul DNA yang berperan sebagai vektor harus memiliki beberapa syarat seperti memiliki penanda awal replikasi/*origin of replication* (ORI), gen penanda seleksi (umumnya berupa gen resistan pada antibiotik), dan situs pengenalan restriksi yang unik (*multiple cloning sites/MCS*) (Snustad & Simmons 2003: 486). Vektor dapat berupa plasmid, *bacteriophage*, fagemid, kosmid, *yeast artificial chromosomes* (YACs), dan *bacterial artificial chromosomes* (BACs).

Salah satu tipe vektor yang sering digunakan dalam teknik kloning adalah plasmid. Plasmid merupakan molekul DNA yang berbentuk lingkaran (sirkular) beruntai ganda di luar kromosom yang dapat melakukan replikasi sendiri di dalam sel bakteri (Snustad & Simmons 2003: 487). Plasmid memiliki gen penanda seleksi dominan, yaitu gen resistan antibiotik (Twyman 1998: 328). Berdasarkan fungsinya vektor terdiri atas dua jenis, yaitu vektor kloning dan vektor ekspresi. Vektor kloning adalah vektor yang digunakan untuk memperbanyak atau kloning gen. Vektor ekspresi merupakan vektor yang tidak hanya dapat bereplikasi sendiri, tetapi juga mengandung sinyal-sinyal ekspresi, sehingga gen yang dikloning juga dapat ditranskripsi menjadi mRNA dan kemudian ditranslasi menjadi protein. Tiga sinyal ekspresi yang paling penting antara lain promoter transkripsi, terminator transkripsi, dan tempat pengikatan ribosom (Brown 1987: 191). Salah satu contoh vektor ekspresi adalah vektor pET. Vektor ekspresi pET didesain untuk meningkatkan mempermudah proses kloning, deteksi, dan pemurnian protein target. Vektor ekspresi pET mengandung beberapa elemen yang penting seperti gen *lacI* yang mengkode protein *lac* repressor, promoter T7 yang hanya spesifik dengan T7 RNA polimerase (Novagen 2004 : 2). Salah satu contoh vektor ekspresi pET adalah pETBlue-2. Peta vektor ekspresi pETBlue-2 dapat dilihat pada Gambar 2.3.1.2.

Vektor ekspresi pETBlue-2 merupakan vektor ekspresi yang mengandung gen resisten ampisilin dan gen *lacZ α* yang berperan dalam seleksi antibiotik dan seleksi biru putih. Seleksi biru putih bersifat terpisah dari ekspresi protein target karena terletak sedemikian rupa hingga orientasinya berlawanan dengan orientasi ekspresi protein target. pETBlue-2 memiliki *Multiple Cloning Site* (MCS) untuk enzim restriksi *NcoI*, *EcoRV*, *SmaI*, *Ecl136II*, *SacI*, *BamHI*, *EcoRI*, *BsrGI*, *AscI*, *BssHIII*, *PstI*, *Sse8387I*, *Sall*, *AatII*, *HincII*, *ClaI*, *MluI*, *Nsp V*, *Hind III*, *Eag I*, *Not I*, *Pvu II*, *Bst1107 I*, *Pml I*, *Xho I*, *Pac I* (Novagen 2004 : 17).

Vektor pETBlue-2 merupakan vektor ekspresi berukuran 3652 bp yang dibuat untuk kloning dan ekspresi protein. Vektor pETBlue-2 memiliki fragmen His.Tag™ yang digunakan untuk deteksi dan purifikasi protein target (Novagen 2004: 12). Vektor ekspresi pETBlue-2 juga dilengkapi dengan, *multiple cloning*

site, dan situs ORI. Vektor pETBlue-2 dilengkapi dengan elemen promoter T7 yang dikenali oleh T7 RNA polimerase. Vektor tersebut membawa gen β -lactamase (*bla*) yang memberikan resistensi terhadap ampisilin dan dapat seleksi biru putih (Novagen 2004: 13). Vektor pET lainnya yang sering digunakan untuk kloning dan ekspresi protein antara lain pET-21, pET-23, pET-24, dan pET-39b (Novagen 2004: 12--13).



Gambar 2.3.1.2 Peta vektor ekspresi pETBlue-2
[Sumber: Novagen 2004: 2]

2.3.1.3 Enzim restriksi

Enzim restriksi merupakan endonuklease yang memecahkan ikatan fosfodiester pada situs pengenalan spesifik dari DNA (Wong 1997: 69). Enzim restriksi dibedakan berdasarkan hasil potongan yang dihasilkan. Beberapa enzim memotong kedua untai DNA pada posisi yang sama dan akan menghasilkan ujung potongan *blunt end*. Contoh enzim tersebut adalah *HaeIII*, *HindII* dan *SmaI*.

Potongan *blunt end* dihasilkan jika enzim restriksi memotong DNA tepat pada bagian tengah situs pengenalannya. Beberapa enzim memotong untai DNA pada posisi yang berbeda dan menghasilkan potongan kohesif yang disebut *sticky end*. Contoh enzim tersebut adalah *EcoRI*, *HindIII* dan *PstI* (Wong 1997: 70)

2.3.1.4 Ligasi

Ligasi adalah suatu proses penggabungan fragmen DNA yang saling berlinear dengan menggunakan ikatan kovalen. Proses ligasi dikatalis oleh enzim ligase dengan bantuan ATP. Enzim ligase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan kembali ikatan fosfodiester antar potongan fragmen DNA. Contoh enzim ligase adalah *bakteriophage T4 DNA ligase*. Enzim ligase digunakan dalam teknik rekayasa genetika karena mampu menyambungkan fragmen DNA ujung rata (*blunt end*) dan ujung kohesif (*sticky end*). Enzim-enzim ligase lainnya yaitu *E. coli DNA ligase* dan *thermostable DNA ligase* (Sambrook & Russell 2001: 1.157--1.159).

2.3.1.5 Sel inang

Sel inang dipilih berdasarkan tujuan kloning dan asal gen yang dikloning. Karakteristik sel inang yang baik antara lain memiliki laju pertumbuhan cepat, tumbuh dalam jumlah yang banyak, nonpatogenik, genom telah dipetakan, dapat menerima vektor, dapat menjaga stabilitas gen asing, dan dapat mengekspresikan gen asing (Tamarin 2002: 358).

Sel inang prokariot yang umum digunakan adalah *Escherichia coli*, sedangkan sel inang eukariot yang umum digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri berbentuk batang gram negatif yang dapat tumbuh dengan cepat dalam medium pengayaan, serta memiliki banyak galur yang telah dikarakterisasi (Davis *dkk.* 1994: 47). Galur-galur *E. coli* yang sering digunakan dalam rekayasa genetika antara lain BL21, DH1, DH5 α , JM103, XL1-*Blue*, dan JM109 (Sambrook & Russell 2001: 15.2;A3.6--A3.10). Novablue merupakan salah satu contoh sel inang. Novablue adalah sel inang yang baik

untuk kloning DNA karena memiliki efisiensi transformasi yang tinggi hasil dari mutasi *recA* dan *endA*. Novablue tidak mengandung T7 RNA polimerase sehingga ideal dalam pembentukan plasmid dalam kondisi non ekspresi. (Novagen 2006: 10)

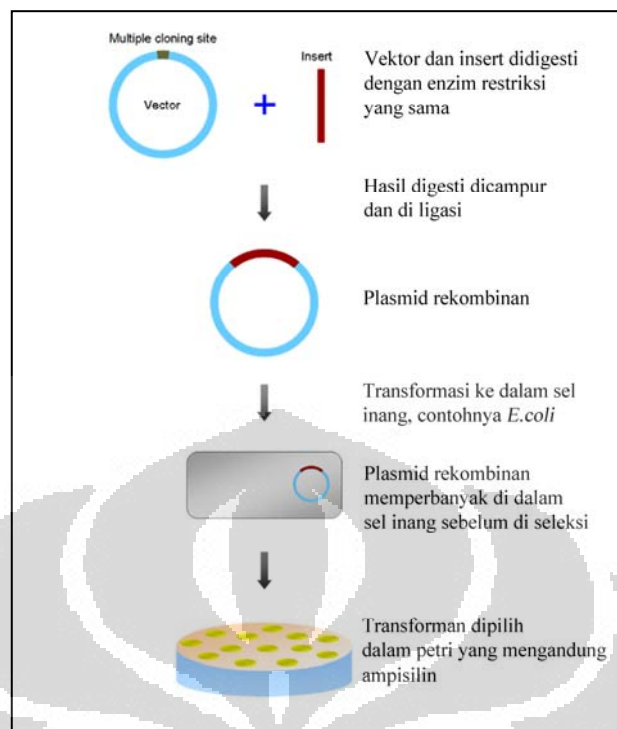
Ekspresi protein rekombinan pada umumnya menggunakan sel inang *E. coli* BL21 dikarenakan mempunyai stabilitas dan kontrol yang tinggi dalam mengekspresikan protein. BL21 adalah salah satu strain *E. coli* yang mengandung lisogen lambda *bakteriophage* dengan imunitas *bakteriophage* 21. *E. coli* BL21 terdiri atas beberapa jenis, yaitu *E. coli* BL21, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysE, dan *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene 2004: 7). Sel inang *E. coli* BL21 digunakan untuk mengekspresikan DNA rekombinan menjadi protein karena mempunyai T7 RNA polimerase yang akan dikenali oleh promoter T7 vektor ekspresi pET. T7 RNA polimerase hanya spesifik ada pada *E. coli* BL21 dan tidak terdapat pada sel prokariotik manapun (Novagen, 2004: 19)

2.3.2 Tahapan-tahapan proses kloning

Tahapan-tahapan kloning meliputi pemilihan sampel DNA, penyisipan DNA ke dalam vektor, transformasi vektor rekombinan ke dalam sel inang dan *Screening* (Gambar 2.3.2).

2.3.2.1 Pemilihan sampel DNA

Sampel DNA yang dipilih dalam proses kloning tergantung dari tujuannya. Sampel DNA dapat berupa DNA genom apabila kloning bertujuan mengetahui regulasi dan transkripsi suatu protein, sedangkan apabila kloning bertujuan mengetahui sekuen asam amino pada suatu protein, maka informasi lebih mudah didapatkan dari sekuen nukleotida yang berasal dari cDNA (Watson *dkk.* 1992: 100).



Gambar 2.3.2 Tahapan-tahapan kloning
[Sumber: MolekularHUB 2011: 3. Telah diolah kembali]

2.3.2.2 Penyisipan DNA ke dalam vektor

Fragmen DNA dan vektor harus dipotong terlebih dahulu, sebelum fragmen DNA disisipkan ke dalam vektor. Pemotongan fragmen DNA dan vektor dilakukan menggunakan enzim restriksi yang sama (Campbell *dkk.* 2002: 392). Enzim restriksi akan memotong fragmen DNA dan vektor pada situs spesifik, dengan tujuan agar vektor dan fragmen DNA memiliki ujung-ujung yang saling bersesuaian (*sticky end* atau *blunt end*). Proses selanjutnya adalah ligasi. Ligasi dilakukan dengan cara menggabungkan fragmen DNA dan vektor yang telah dipotong kemudian digabungkan melalui ikatan kovalen menggunakan enzim ligase (Wong 1997: 71).

2.3.2.3 Transformasi vektor rekombinan ke dalam sel inang

Proses introduksi DNA asing ke dalam sel inang disebut transformasi. Berdasarkan tujuan transformasi sel inang dapat dibedakan menjadi dua

kelompok, yaitu sel inang sementara dan sel inang tetap. Sel inang sementara yaitu sel yang digunakan hanya untuk memperbanyak jumlah sel DNA rekombinan sedangkan sel inang tetap yaitu sel inang yang digunakan untuk mengekspresikan gen asing yang dikloning (Sjahril 2008: 70).

Terdapat beberapa metode transformasi. Pemilihan metode yang digunakan bergantung sel inang yang digunakan. Transformasi DNA dapat dilakukan dengan metode CaCl_2 dan elektroporasi, dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*, biolistik atau *particle bombardment*, mikroinjeksi, dan transfer dengan polietilen glikol (PEG) (Wong 1997: 133). Penggunaan CaCl_2 pada metode CaCl_2 yang dipicu kejutan panas (*heat shock*) dapat menyebabkan DNA menempel pada membran luar sel kompeten, setelah diberi kejutan panas DNA dapat masuk ke dalam sel kompeten (Wong 1997 133-134). Efisiensi transformasi metode kejutan panas berkisar antara 10^5 -- 10^6 transforman/ μg (Sambrook & Russell 2001: 1.24)

Transformasi dengan metode elektroporasi memanfaatkan kejutan listrik langsung pada sel kompeten. Teknik elektroporasi dilakukan dengan menggunakan alat yang disebut elektroporator. Energi yang digunakan pada teknik elektroporasi dapat mencapai hingga 50.000 V. Kejutan listrik tersebut akan mengganggu kestabilan membran *E. coli* sehingga akan terbentuk pori-pori pada membran sel. Pori-pori tersebut memungkinkan membran sel terbuka serta membuatnya menjadi permeabel. Hal tersebut menyebabkan molekul DNA dapat masuk ke dalam sel (Wong 1997: 134). Efisiensi transformasi yang diperoleh antara 10^7 -- 10^9 transforman/ μg DNA (Sambrook & Russell 2001: 1.25-1.26)

2.3.2.4 Screening

Screening merupakan tahapan untuk menyeleksi vektor rekombinan hasil kloning. *Screening* vektor rekombinan dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain dengan menguji sensitivitas dan resistensi terhadap antibiotik, menumbuhkan sel transforman pada medium selektif nutrien, seleksi biru putih atau α -komplementasi, analisis restriksi dari DNA plasmid dan hibridisasi asam nukleat. Uji sensitivitas dan resistensi antibiotik dapat dilakukan apabila vektor

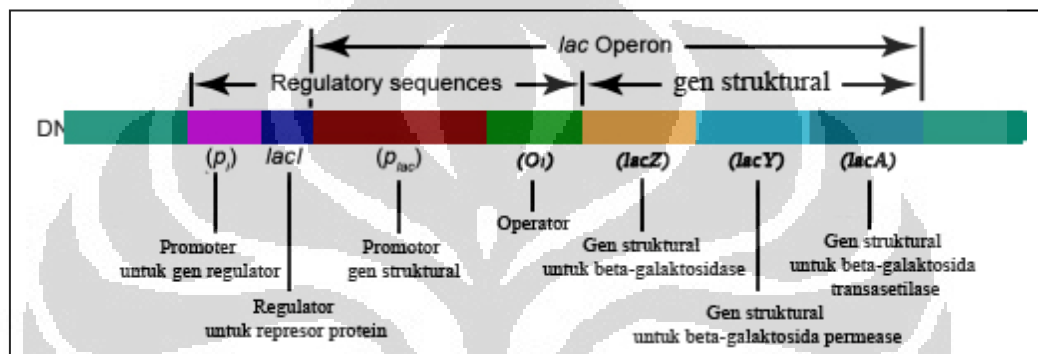
pengklonaan membawa sedikitnya satu gen penyebab resistensi terhadap antibiotik pada sel inang, misalnya ampisilin (*amp^R*). Ampisilin dapat menghambat sejumlah enzim yang memengaruhi sintesis dinding sel bakteri. Gen resisten ampisilin atau gen *bla* pada vektor mengkode enzim β -laktamase yang disekresikan ke dalam ruang periplasmik bakteri. Enzim tersebut akan mengkatalis reaksi hidrolisis cincin β -laktam ampisilin sehingga bakteri menjadi resistan terhadap ampisilin (Sambrook & Russel 2001: 1.6 & 1.85)

Seleksi biru putih atau α -komplementasi terjadi ketika dua fragmen yang inaktif bersatu membentuk enzim β -galaktosidase yang fungsional. Enzim β -galaktosidase menghidrolisis laktosa menjadi glukosa. Aktifitas enzim tersebut dapat diuji dengan menggunakan senyawa 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosidase (X-gal) yang menghasilkan warna biru pada medium. Enzim tersebut dihasilkan oleh gen *lacZ* pada MCS vektor pengklonaan. Isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG) juga digunakan sebagai inducer untuk menonaktifkan represor *lacZ*. Bakteri yang mengandung plasmid rekombinan tidak menghasilkan enzim β -galaktosidase sehingga pada medium akan berwarna putih, sedangkan bakteri yang tidak mengandung vektor rekombinan tetap menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dapat memecah senyawa X-gal, sehingga koloni akan berwarna biru (Sambrook & Russell 2001: 1.149 -- 1.150).

2.4 Ekspresi pada Sel Prokariot

Ekspresi gen merupakan suatu proses transkripsi materi genetik (DNA) di dalam sel menjadi RNA dan selanjutnya ditranslasi menjadi polipeptida yang spesifik (Madigan *dkk.* 2009: 225). Mekanisme dasar terhadap pengendalian ekspresi gen dalam sel prokariot dinamakan konsep operon, yaitu pengekspresian suatu gen struktural dengan menggunakan satu promoter yang sama. Gen utama yang berperan dalam konsep operon ada dua tipe, yaitu gen struktural dan gen regulator (Gambar 2.4.(1)). Gen struktural merupakan bagian yang berada di bagian *downstream* dari promoter dan mengandung urutan DNA spesifik yang akan ditranskripsi, sedangkan gen regulator berperan penting dalam mengatur proses ekspresi gen (Fairbanks & Andersen 1999: 218; Yuwono 2005: 134).

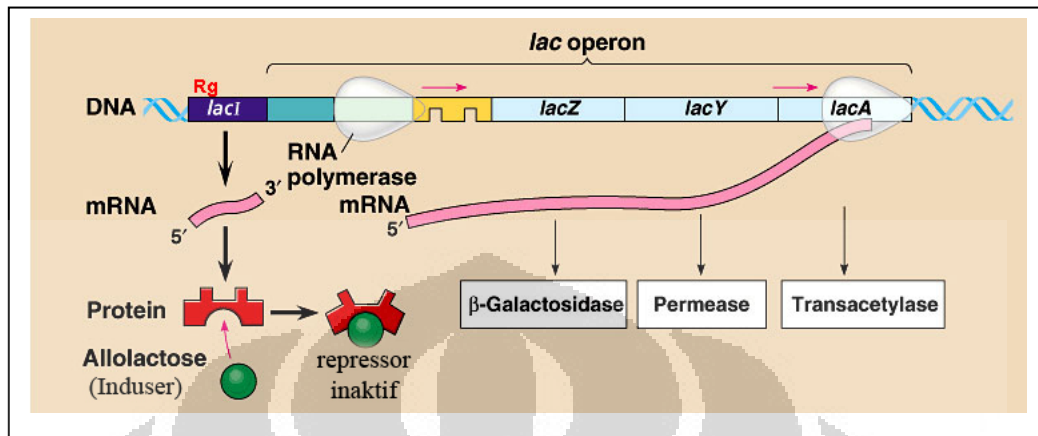
Gen regulator terdiri atas beberapa elemen utama, yaitu promotor, operator, dan terminator. Promotor adalah sekuen DNA spesifik yang dapat dikenali oleh RNA polimerase, sehingga proses transkripsi dapat berjalan. Operator adalah suatu sekuen nukleotida yang terletak di antara promotor dan gen struktural, serta merupakan tempat pelekatan protein represor (Yuwono 2005: 138--139). Terminator adalah sekuen DNA yang terletak di sebelah hilir dari gen struktural dan berperan dalam memberikan sinyal terhadap RNA polimerase untuk menghentikan proses transkripsi (Yuwono 2005: 141).



Gambar 2.4(1) Struktur gen dalam Operon *lac*
[Sumber: Anderson & Purdom 2009: 4. Telah diolah kembali]

Sistem operon *lac* merupakan salah satu konsep operon yang banyak digunakan dalam rekayasa genetika untuk mengeskpresikan gen asing sehingga dapat menghasilkan suatu protein rekombinan. Mekanisme ekspresi gen asing dalam sel prokariot seperti *E. coli* dapat dilakukan melalui induksi Isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG). IPTG merupakan senyawa yang strukturnya mirip dengan laktosa tetapi tidak dimetabolisme oleh sel dan dapat digunakan untuk menginduksi ekspresi suatu gen di bawah kontrol promotor *lac* (Yildir *dkk.* 1998: 221). Proses induksi IPTG dimulai dengan terikatnya IPTG pada situs pengikatan induser yang terdapat pada protein represor. Adanya kompleks induser (IPTG) represor menyebabkan terjadinya perubahan struktural sehingga dapat merubah situs pengikatan protein represor dengan situs pengikatan represor pada operator (Gambar 2.4.(2)). Hal tersebut menyebabkan tidak adanya interaksi yang terjadi antara protein represor dengan operator, sehingga RNA polimerase sel inang dapat memulai proses transkripsi gen struktural yang terletak setelah

promoter dan selanjutnya ditranslasi menjadi protein yang diinginkan (Snustad & Simmons 2003: 578--579).

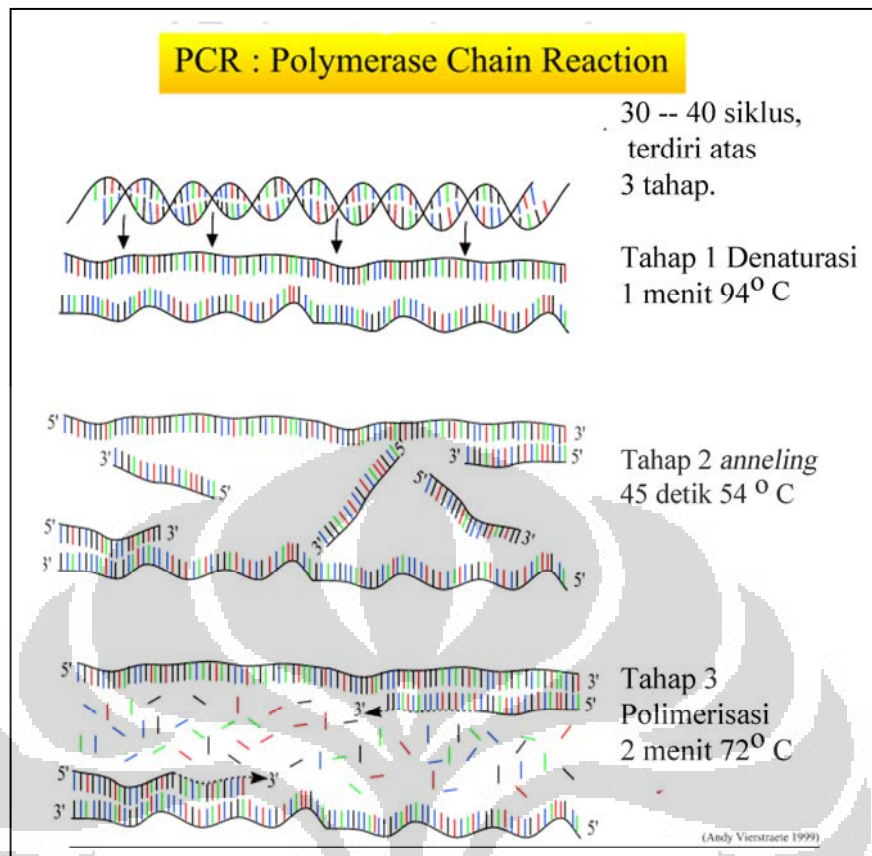


Gambar 2.4.(2)Mekanisme ekspresi bakteri dengan induksi IPTG
[Sumber: Cambell *dkk.*2002: 363. Telah diolah kembali]

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler untuk memperbanyak atau amplifikasi sekuen DNA yang spesifik menjadi jutaan salinan secara *in vitro* (Gambar 2.5). Prinsip kerja dari PCR adalah reaksi enzimatik dari proses polimerisasi DNA untuk memperbanyak bagian-bagian spesifik DNA yang diinisiasi oleh pelekatan primer. Primer yang digunakan pada proses PCR, yaitu primer *forward* dan *reverse*. Primer tersebut akan mengagrip daerah spesifik pada DNA yang akan diperbanyak dan menginisiasi replikasi DNA tersebut (Klug & Cummings 1994: 402).

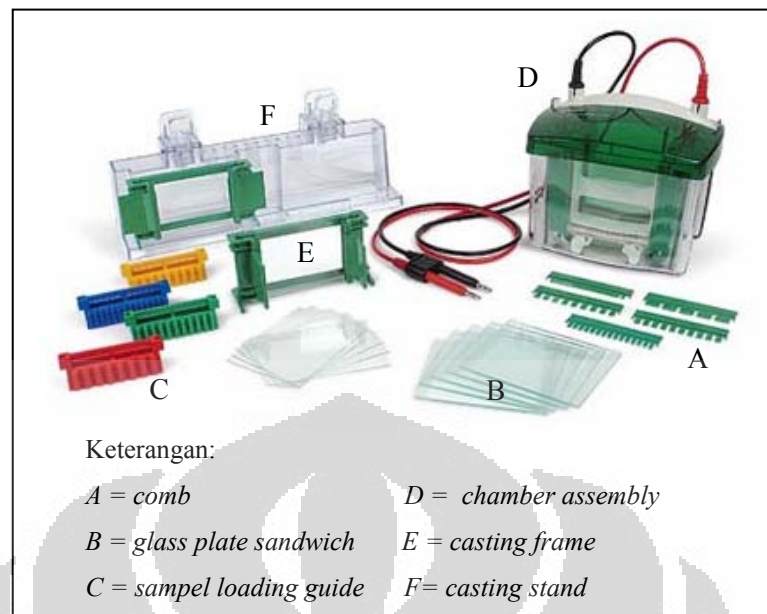
Komponen-komponen yang digunakan pada proses PCR antara lain DNA *template*, PCR *buffer*, dNTP, *primer*, kation divalen, *Taq DNA polymerase*, dan akuabides. Setiap komponen memiliki fungsi yang penting dalam proses PCR (Leonard *dkk.* 1994: 116--126). Siklus PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing* (pelekatan), dan polimerisasi (pemanjangan primer sehingga membentuk rantai DNA yang diinginkan) (Klug & Cummings 1994: 291 & 403).



Gambar 2.5 Siklus PCR
[Sumber: Vierstraete 1999: 1. Telah diolah kembali.]

2.6 *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah suatu metode elektroforesis gel poliakrilamid untuk protein dalam keadaan terdenaturasi. Perangkat SDS PAGE dapat dilihat pada Gambar 2.6. SDS yang berfungsi untuk mendenaturasi protein dalam bentuk protein sekunder, tersier, dan kuartener menjadi struktur yang lebih sederhana. Fungsi lain dari SDS adalah untuk menghambat interaksi hidrofobik dan merusak ikatan hidrogen.

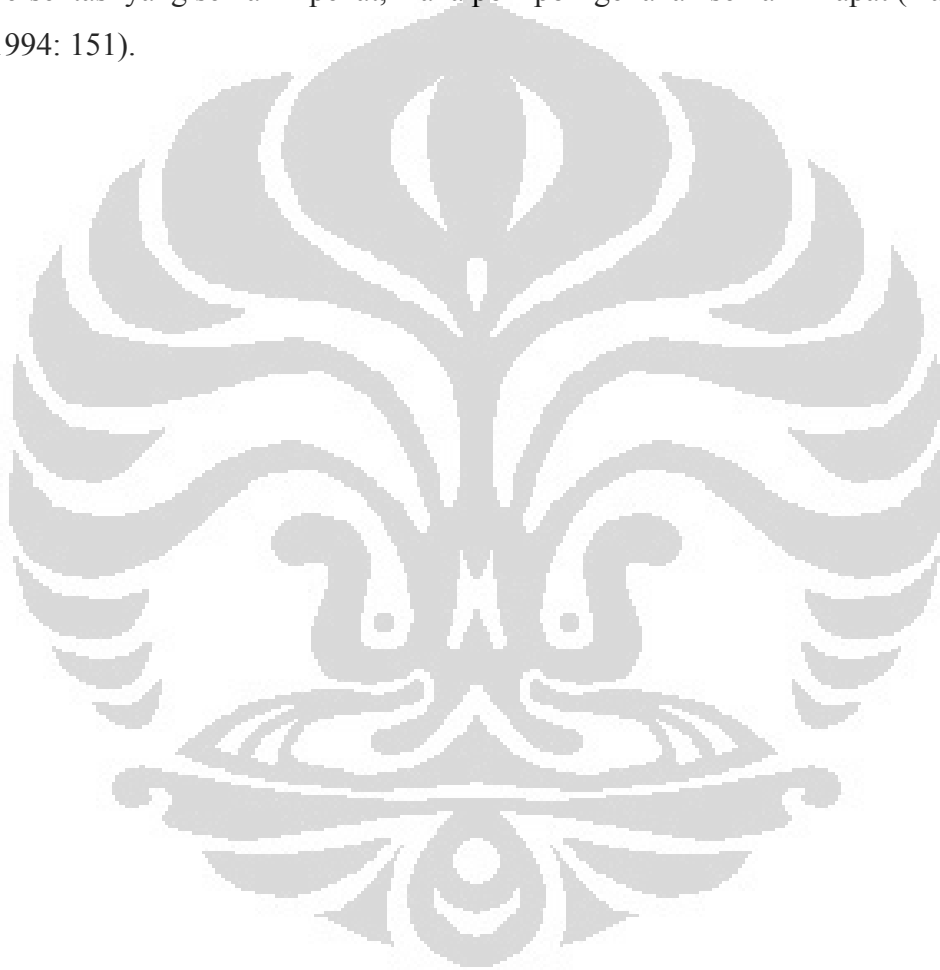


Gambar 2.6 Mini-PROTEAN Tetra Cell
[Sumber: Bio-rad 2011: 1]

Hal tersebut karena SDS merupakan sejenis deterjen yang dapat melarutkan molekul yang hidrofobik dan memiliki muatan negatif yang dapat berikatan pada protein (Davis *dkk.* 1994: 157). Berdasarkan gel dan *buffer* yang digunakan metode SDS PAGE dapat dibagi menjadi dua, yaitu sistem *continuous* dan *discontinuous*. Sistem *continuous* hanya menggunakan satu *running gel* serta menggunakan *buffer* yang sama untuk pembuatan gel dan proses elektroforesis. Sistem *discontinuous* menggunakan dua jenis gel yang berbeda yaitu *stacking gel* dan *separating gel*, *buffer* yang digunakan juga berbeda baik untuk pembuatan gel maupun pada proses *running*. *Separating gel* terletak di bagian bawah dan mempunyai pH sekitar 8,8 dengan konsentrasi akrilamid 5--30%, sedangkan *stacking gel* berada di bagian atas dari *running gel* dan mempunyai pH sekitar 6,8 dengan konsentrasi akrilamid 3--5%. Perbedaan pH dan konsentrasi akrilamid yang digunakan berfungsi agar protein terkonsentrasi lebih dahulu pada *stacking gel* sebelum dipisahkan oleh *separating gel* saat proses berlangsung sehingga migrasi protein terjadi bersama-sama (Gallagher 1995: 10.1.29).

Proses penting dalam SDS-PAGE adalah pewarnaan (*staining*). Pewarnaan yang digunakan untuk melihat sampel pada proses SDS-PAGE terdiri atas *commasie blue staining*, *silver salt staining*, dan *cyber green*. Pewarnaan

dengan *commasie blue staining* membutuhkan waktu yang lebih cepat karena dapat mengikat protein secara spesifik. Hasil yang diperlihatkan sampel pada pewarnaan dengan *commasie blue staining* adalah berwarna biru (Boyer 1993: 119--125). Proses pemisahan molekul dalam SDS-PAGE dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya ukuran pori-pori gel, muatan yang dikandung dalam sampel, ukuran molekul, dan bentuk protein. Ukuran pori-pori gel bergantung pada persentase gel yang digunakan, apabila gel yang digunakan memiliki persentasi yang semakin pekat, maka pori-pori gel akan semakin rapat (Davis *dkk.* 1994: 151).



BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioakuakultur, Laboratorium Pusat Teknologi Produksi Pertanian (PTPP), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (Puspiptek) Serpong. Penelitian berlangsung selama dua belas bulan, terhitung sejak Januari 2011 hingga Desember 2011.

3.2 Sampel

Sampel berupa konstruksi plasmid pMBA*tiGH* (Beta Aktin Medaka *tilapia Growth Hormone*) yang dikonstruksi di Jepang oleh Kobayashi *dkk.* (2004: 430). Konstruksi tersebut membawa DNA hormon pertumbuhan ikan nila dalam bentuk cDNA *tiGH* berukuran 830 bp. Konstruksi plasmid tersebut memiliki ukuran 7,9 kb.

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan habis pakai

White tip [Biologix], *yellow tip* [Biologix], *blue tip* [Biologix], sarung tangan [Sensi Glove], masker [tanpa merek], *wrap plastic* [Klin Pac], *aluminium foil* [Diamond], *tissue* [Tessa], tusuk gigi, *microcentrifuge tube* 1,5 ml [Biologix], dan parafilm [Sigma].

3.3.2 Bahan kimia

Fenol (25) : kloroform (24) : isoamil alkohol (1), etanol absolut [Merck], *TE buffer*, RNase [Fermentas], dNTP 2 mM [Fermentas], *Dream taq buffer*

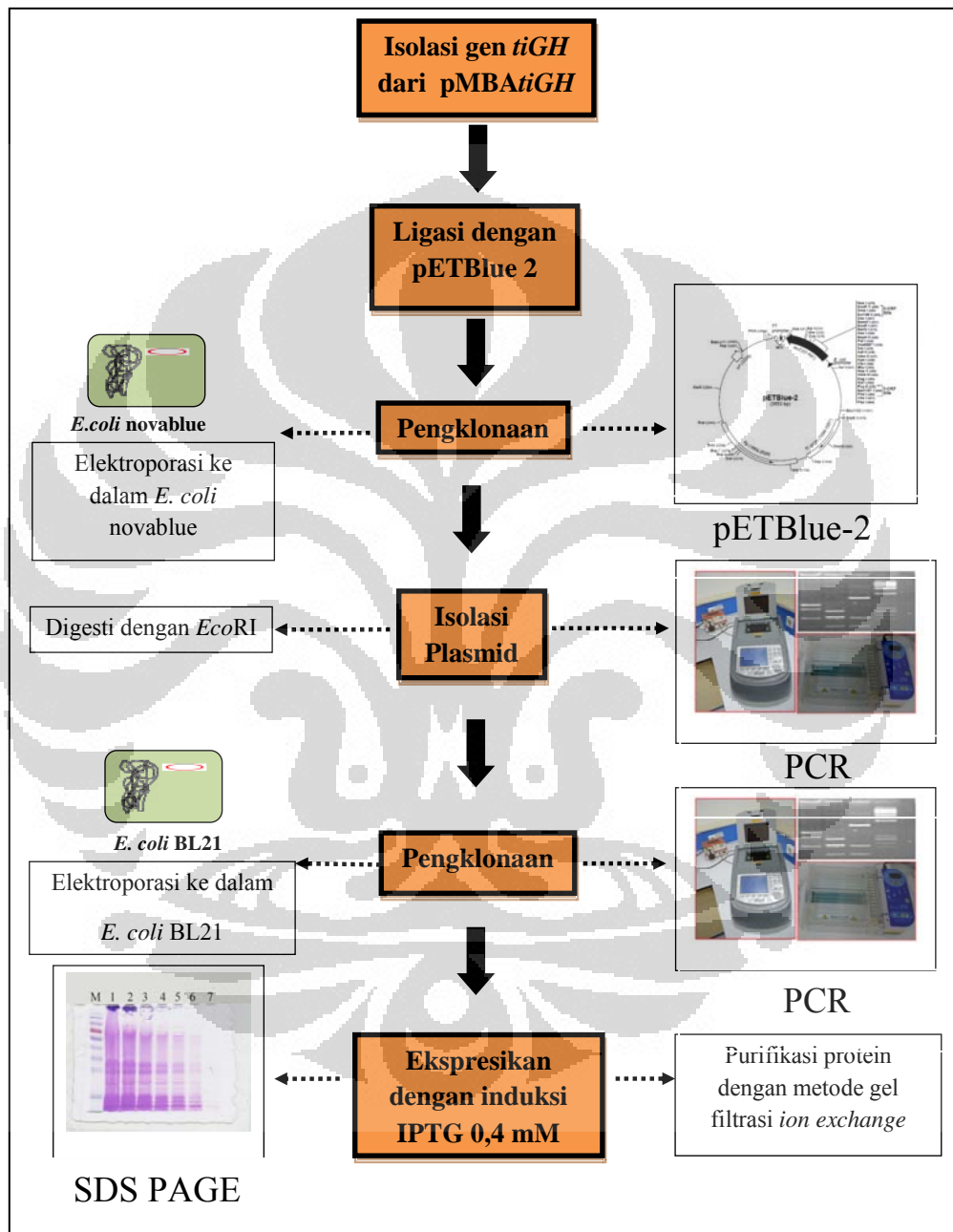
[Fermentas], *Dream taq* [Fermentas], bubuk agarosa [Fermentas], 1x TBE *buffer* [Fermentas], 6x *loading dye* [Fermentas], marka DNA 1 kb [Fermentas], etidium bromida [Merck], tripton [Bio Basic Inc.], *yeast extract* [Bio Basic Inc.], NaCl [Merck], bubuk agar [BiomarkTM Laboratories], pETBlue-2 [Novagen], ampicillin [Fermentas], IPTG [Fermentas], X-Gal [Fermentas], *Sodium deodesil sulfat* (SDS) 10 %, akuabides, TEMED [Pharmacia biotech], marka protein [Fermentas], *Commasie brilliant blue* [Biochemicals], 30% akrilamid [Biobasic], asam asetat glasial [Merck], metanol [Merck], ammonium persulfat (APS)[Plusone], *glycine* [MERCK], triton [Sigma], etanol [Merck], PBS, gliserol[Merck], *bromophenol blue* [BDH], Tris [Merck], dan Sephadex G-25 [Pharmacia biotech].

3.4 Peralatan

Cawan petri, *hot plate with magnetic stirrer* [Cimarec-2], vorteks [Heidolph REAX 2000], apparatus elektroforesis [Mupid-ex U], UV transilluminator, *microwave oven* [Panasonic], elektroporator [Bio-rad], pompa vakum [Vitlab], kamera digital [Canon Power Shot S5IS], *beaker glass* 100 ml dan 200 ml [Iwaki pyrex], gelas ukur 100 ml [Iwaki pyrex], erlenmeyer 250 ml, 500 ml dan 2000 ml [Iwaki pyrex], pipet mikro 0,1 -- 2,5 μ l, 2,5 -- 10 μ l, 10 -- 100 μ l, 100 -- 1000 μ l [Dragon med], autoklaf destruksi [Hirayama], autoklaf sterilisasi [ALP KT-40], *Freezer 4° C* [Sanyo], *Freezer -20° C* [LG Expresscool], *Freezer -40°* [Heire], oven [Memmert], inkubator [Memmert], pH meter [La motte], *gel ice* [Cool Master], sentrifugator [Hettich zentrifugen], spidol permanen [Faber castle], *laminar flow cabinet* [Esco], *shaker incubator* [Yih der], apparatus SDS PAGE [Biorad], mesin PCR [ESCO Swift-Maxi], timbangan digital [Kern-ew], sonikator [Sonics VCF1500], korek api, *cool box*, pinset, ose, alas timbangan, *triangle spreader*, dan gelas ukur plastik 100 ml.

3.5 Skema Kerja Penelitian

Skema kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Skema kerja penelitian

3.6 Cara kerja

3.6.1 Pembuatan larutan dan *buffer*

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

3.6.2 Isolasi gen *tiGH*

Gen *tiGH* diisolasi dengan cara memisahkan gen *tiGH* dari plasmid pMBA*tiGH*. Pemisahan dilakukan dengan teknik digesti berdasarkan Fermentas (2006: 121). Digesti dilakukan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Komposisi reaksi digesti dapat dilihat pada Lampiran 2. Semua bahan untuk reaksi digesti disiapkan di dalam kotak es, kecuali enzim restriksi (tetap disimpan pada suhu -20 °C). Enzim restriksi ditambahkan terakhir pada reaksi digesti. Campuran reaksi diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 37 °C, dan dilakukan inaktivasi selama 10 menit pada suhu 65 °C.

3.6.3 Pemisahan fragmen DNA dengan elektroforesis gel agarosa

Pemisahan fragmen DNA dilakukan melalui elektroforesis gel agarosa berdasarkan Ausubel *dkk.* (2002: 2-13). Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 1% dalam TBE *buffer* 1x. Sampel DNA ditambahkan dengan 6x *loading dye*. Campuran kemudian dihomogenisasi dengan cara pemipetan dan campuran dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Marka 1 kb DNA *ladders* dimasukkan ke dalam masing-masing sumur gel sebagai pembanding ukuran fragmen DNA. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 V selama 25 -- 30 menit. Gel agarosa dimasukkan ke dalam wadah berisi etidium bromida (EtBr) selama 15--30 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat di bawah sinar UV, kemudian difoto menggunakan kamera digital. Hasil positif ditandai dengan munculnya 3 fragmen DNA berukuran 4000 bp, 3500 bp dan 830 bp.

3.6.4 Ekstraksi dan purifikasi DNA gen *tiGH* dari gel

Ekstraksi dan purifikasi DNA dari gel agarosa dilakukan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* berdasarkan Geneaid (2003: 2).

Gel agarosa yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan dipotong (berat \pm 300 mg) dengan *scalpel* dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml kemudian ditambahkan 500 μ l *DF buffer*. Tabung diinkubasi pada suhu 55--60° C selama 10 menit, setiap 2 menit sekali tabung dihomogenisasikan dengan cara divortek. Potongan gel yang telah larut didinginkan pada suhu 27 °C. Kolom *DF* ditempatkan pada tabung koleksi 2 ml. Sebanyak 800 μ l campuran potongan gel yang telah larut dipindahkan ke dalam kolom *DF*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 4 °C. Cairan yang berada dalam tabung koleksi dibuang, lalu tabung koleksi dipasang kembali dengan kolom *DF*. *Wash buffer* sebanyak 600 μ l ditambahkan ke dalam kolom *DF*, kemudian didiamkan selama 1 menit. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada suhu 4 °C, cairan yang berada dalam tabung koleksi dibuang, lalu tabung koleksi dipasang kembali dengan kolom *DF*. Tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4 °C. Tujuan sentrifugasi tersebut adalah untuk proses pengeringan. Kolom *DF* yang sudah kering dipindahkan ke tabung 1,5 ml, kemudian ditambahkan 15--50 μ l *elution buffer* atau *TE buffer* dan didiamkan selama 2 menit. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu 4 °C. Hasil purifikasi kemudian di elektroforesis untuk memastikan hasil purifikasi. Hasil positif purifikasi gen *tiGH* di tandai dengan munculnya band tunggal berukuran 830 bp.

3.6.5 Ligasi gen *tiGH* dan vektor ekspresi pETBlue-2

Proses ligasi dilakukan berdasarkan *Perfectly Blunt® Cloning kits* (Novagen 2004: 9). Komposisi campuran dapat dilihat pada Lampiran 3.

Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 22 °C, kemudian diinaktivasi selama 5 menit pada suhu 75 °C. Campuran diinkubasi dalam es selama 2 menit.

Proses selanjutnya adalah memasukkan 1 μl *blunt vector* dan 1 μl T4 DNA ligase ke dalam campuran dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 22 °C.

3.6.6 Pembuatan sel kompeten *E. coli* novablue dan *E. coli* BL21

Satu koloni *E. coli* dipindahkan ke dalam 50 ml medium LB (Luria Bertani) cair, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam pada suhu 37 °C. Sebanyak 10 ml kultur *E. coli* disubkultur ke dalam 100 ml medium LB, kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama \pm 3 jam pada suhu 37 °C. Sebanyak 500 μl kultur *E. coli* kemudian dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasi di dalam es selama 10 menit. Kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C lalu didekantasi, dan ditambahkan 600 μl gliserol 10 % (v/v). Kultur disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C kemudian didekantasi. Pelet diresuspensi dengan 100 μl gliserol 10 % dan disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -40 °C.

3.6.7 Transformasi ke dalam *E. coli* novablue

Sel kompeten *E. coli* novablue dicampur dengan hasil ligasi dengan perbandingan 20 : 1, kemudian dihomogenkan dalam tabung 1,5 ml dengan suhu 4 °C. Campuran dimasukkan ke dalam kuvet elektroporasi yang telah didinginkan. Kuvet yang digunakan memiliki ukuran celah 0,4 cm dan diberikan kejutan listrik dengan voltase 2,5 kV selama 5 detik. Sebanyak 900 μl medium SOC dimasukkan ke dalam kuvet elektroporasi dan dihomogenkan. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasi di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm selama 60 menit pada suhu 37 °C. Sebanyak 50 -- 100 μl di-*spread* ke dalam empat cawan petri yang berisi medium LB padat dengan konsentrasi akhir ampisilin 100 μl /ml dan kemudian diinkubasi selama *overnight* pada suhu 37 °C.

3.6.8 Isolasi plasmid

Koloni yang tumbuh kemudian dilakukan isolasi plasmid dengan menggunakan teknik *alkaline lysis solution minipreparation* (Sambrook & Russell 2001: 1.32--1.34). Teknik tersebut menggunakan tiga jenis larutan yaitu *solution I*, *solution II* dan *solution III*. Komposisi *solution I*, *solution II* dan *solution III* dapat dilihat pada Lampiran 4. Sel bakteri ditumbuhkan di dalam medium LB cair yang mengandung ampisilin, diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama *overnight* pada suhu 37 °C. Sebanyak 1,5 ml kultur disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C.

Supernatan yang terbentuk dibuang sedangkan pelet ditambahkan dengan 100 µl *solution I*, lalu dihomogenisasikan hingga pelet tersuspensi seluruhnya. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 27°C. Suspensi ditambahkan *solution II* sebanyak 200 µl dan *invert* sebanyak 3 sampai 4 kali dan diinkubasi selama 5 menit dalam es. Sebanyak 150 µl *solution III* ditambahkan ke dalam suspensi dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan 700 µl fenol : kloroform: isoamil alkohol (25:24:1), campuran kemudian dihomogenisasikan selama 10 menit.

Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung baru, lalu ditambahkan dengan etanol absolut dingin sebanyak 700 µl dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu -20 °C. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan alkohol 70% dingin sebanyak 1 ml. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang didapat dibuang dan pelet dikeringudarkan menggunakan vakum. Setelah kering pelet ditambahkan 20 µl TE *buffer* dan 1 µl RNase lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20 °C.

3.6.9 Verifikasi hasil isolasi plasmid

Identifikasi hasil isolasi plasmid dilakukan dengan metode PCR. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui *insert tiGH*. Pemeriksaan *insert tiGH* menggunakan primer pETBlueDOWN [Novagen] dan pETBlueUP [Novagen] susunan basa primer dapat dilihat pada Lampiran 5, sedangkan untuk pemeriksaan orientasi *insert* terhadap vektor menggunakan primer R_*tiGH* dan primer pETBlueUP. *Master mix* dibuat dengan volume total 10 μ l. Komposisi *master mix* dapat dilihat pada Lampiran 6. *Master mix* didistribusikan ke dalam tabung PCR. Tabung PCR kemudian ditempatkan ke dalam mesin PCR dan menggunakan program PCR (Lampiran 7). Hasil PCR divisualisasi dalam gel agarosa 0,8%. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 25--30 menit. Hasil PCR *insert* positif ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran \pm 1,1 kb. Sedangkan PCR orientasi *insert* terhadap vektor positif ditandai dengan munculnya fragmen DNA berukuran \pm 913 bp.

3.6.10 Verifikasi vektor rekombinan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*

Verifikasi vektor rekombinan dilakukan dengan metode digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Komposisi campuran digesti dapat dilihat pada Lampiran 2. Campuran diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 37 °C dan diinaktivasi selama 20 menit pada suhu 65 °C. Hasil digesti divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Hasil positif digesti gen *tiGH* di tandai dengan munculnya dua band berukuran 955 bp dan 207 bp.

3.6.11 Transformasi ke dalam *E. coli* BL21

Sebanyak 20 μ l kultur kompeten *E.coli* BL21 dicampur dengan 1 μ l vektor rekombinan, kemudian dihomogenkan dalam suhu 4° C. Campuran dimasukkan ke dalam kuvet elektroporasi dengan ukuran celah sebesar 0,4 cm dan diberikan kejutan listrik dengan voltase 2,5 kV selama 5 detik. Sebanyak 900 μ l larutan SOC dimasukan ke dalam kuvet elektroporasi dan dihomogenkan, kemudian

campuran dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasi di dalam *incubator shaker* selama 60 menit pada suhu 37 °C. Campuran tersebut masing-masing sebanyak 100 µl di-*spread* ke dalam empat cawan petri yang berisi medium LB agar dengan konsentrasi ampisilin 25 -- 100 µl/ml. Kemudian diinkubasi selama *overnight* pada suhu 37 °C. Hasil transformasi kemudian di-*streak* ke dalam medium hingga konsentrasi akhir ampisilin 100 µl/ml.

3.6.12 Verifikasi hasil transformasi ke dalam *E.coli* BL21 dengan PCR

Identifikasi hasil pengklonaan dilakukan dengan metode PCR koloni. Identifikasi yang dilakukan untuk mengetahui *insert*. Koloni yang berwarna putih dipilih untuk pemeriksaan *insert* menggunakan primer pETBlueDown [Novagen] dan pETBlueUP [Novagen]. Urutan sekuens basa primer dapat dilihat pada Lampiran 5. Komposisi *master mix* dibuat untuk PCR dapat dilihat pada Lampiran 6. Tabung PCR kemudian ditempatkan ke dalam mesin PCR dan menggunakan program PCR Lampiran 7. Hasil PCR divisualisasi dalam gel agarosa 1%. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 25 hingga 30 menit. Hasil positif ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran ± 1,1 kb.

3.6.13 Ekspresi gen *tiGH* dengan induksi IPTG

Salah satu koloni positif hasil kemudian dikultur ke dalam 200 ml medium LB cair yang telah diberikan ampisilin 100 µl/ml. Kultur diinkubasi selama 16--18 jam pada *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C. Kemudian kultur di subkultur ke dalam 2000 ml medium LB cair dan kembali diinkubasi selama 1--2 jam. Kemudian diberikan IPTG dengan konsentrasi akhir 0,4 mM dan diinkubasi selama ± 4 jam. Pengisolasian protein rekombinan tiGH yang dilakukan mengikuti metode Promdonkoy *dkk.* (2004: 650). Proses diawali dengan melisiskan membran dan dinding sel *E. coli* BL21 menggunakan sonikator. Sonikasi dilakukan menggunakan 6 siklus yaitu dengan 1 menit sonikator dalam keadaan hidup dan 1 menit sonikator dalam keadaan mati. Proses tersebut harus dilakukan pada suhu dingin (-4 °C). Sebelum dilakukan proses

sonikasi diberikan larutan lisis *buffer* untuk meresuspensi pelet. Visualisasi hasil ekspresi dan purifikasi protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 5.44--5.45). Cara kerja SDS-PAGE diawali dengan pembuatan gel (*separating gel* dan *stacking gel*). Komposisi pembuatan *separating gel* dan *stacking gel* dapat dilihat pada Lampiran 8. *Glass plate sandwich (short plate & spacer plate)* dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun dan dibersihkan dengan etanol absolut, kemudian dikeringkan. *Glass plate sandwich* tersebut digunakan untuk tempat cetakan dalam pembuatan gel. *Short plate* ditempatkan di depan kaca *spacer plate*. Kedua kaca dimasukkan ke dalam *casting frame* dengan posisi bagian bawah kedua kaca sama rata kemudian dikunci. *Glass plate sandwich* yang telah siap selanjutnya dipasang pada *casting stand*. Larutan *separating gel* yang telah dibuat dimasukkan di antara celah kaca *short plate* dan *spacer plate* sampai dua pertiga bagian. Larutan *separating gel* yang dituang diusahakan agar tidak terdapat gelembung udara. Larutan akuades kemudian ditambahkan sampai batas atas kaca dan larutan dibiarkan selama kurang lebih 30 menit hingga *separating gel* mengeras.

Pembuatan larutan *stacking gel* sesuai prosedur pada Lampiran 8. Air yang terdapat pada bagian atas *separating gel* dibuang, kemudian dikeringkan dengan tisu agar air tersebut benar-benar hilang. Larutan *stacking gel* dituangkan sampai batas atas kaca *glass plate sandwich* kemudian *comb* dimasukkan. Gel dibiarkan mengeras selama kurang lebih 30 menit. *Gel-glass plate sandwich* tersebut selanjutnya dipindahkan dari *casting frame* dan dipasang pada *electrode assembly* dengan posisi *short plate* menghadap ke dalam kemudian *running buffer* 1x dimasukkan ke dalam *tank* elektroforesis tersebut.

Sampel hasil ekspresi dan purifikasi diambil sebanyak 10 µl lalu dicampur dengan 10 µl *loading dye* 1x di dalam tabung 1,5 ml. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 5 menit pada *waterbath*, lalu campuran sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 detik pada suhu 4 °C untuk menurunkan uap. Masing-masing sampel sebanyak 20 µl dan marka protein sebanyak 10 µl dimasukan ke dalam *well*. Kabel elektroda dipasangkan dengan perangkat elektroforesis kemudian gel di-*running* pada 120 volt selama 90 --120 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan *coomassie brilliant blue R-*

250 *staining solution* selama 30 menit. Gel kemudian dibilas dengan larutan *destaining solution* selama 15--20 menit. Proses pembilasan menggunakan *destaining solution* diulang sebanyak 2 kali. Gel lalu direndam dalam akuades yang selanjutnya dapat disimpan dalam plastik mika sampai kering agar dapat didokumentasikan. Hasil positif SDS page di tandai dengan munculnya band berukuran 22 kDa.

3.6.14 Purifikasi protein rekombinan tiGH

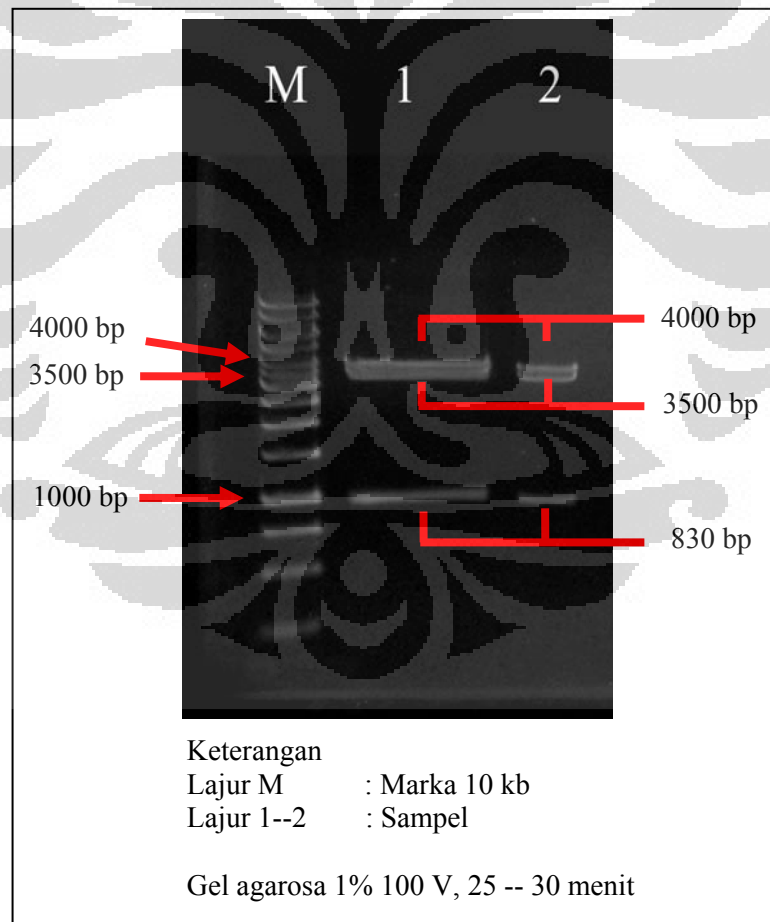
Protein hasil ekspresi kemudian dipurifikasi menggunakan metode *gel filtration ion exchange* [Sphadex G-25]. Sebanyak 150 μ l sampel protein dimasukkan ke dalam *column* yang berisi resin. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Cairan yang tertampung dalam *collection tube* diambil dan divisualisasikan dengan cara SDS PAGE.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

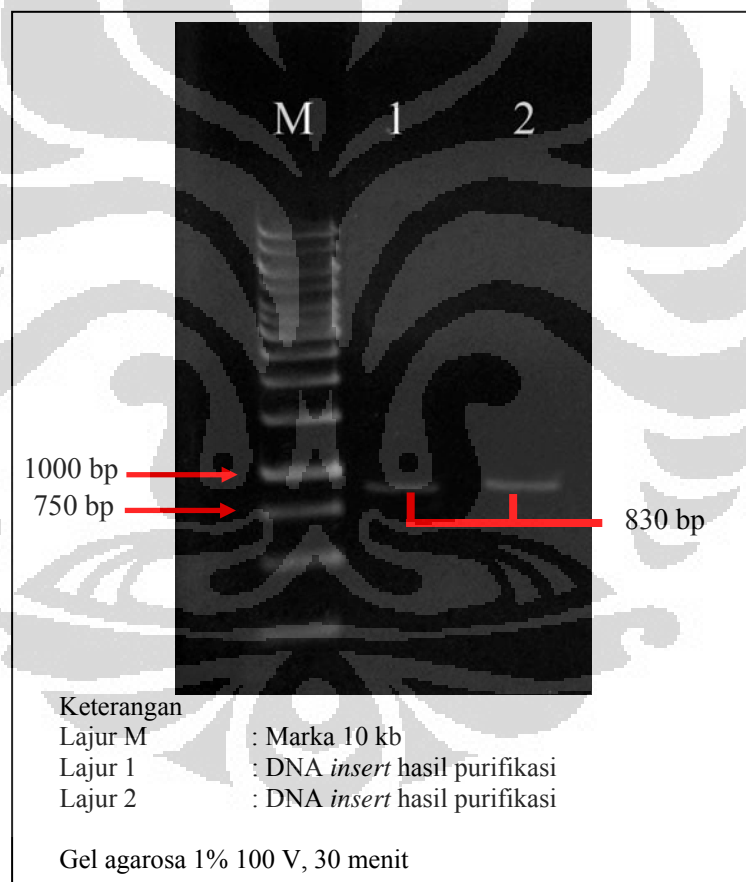
4.1.1 Isolasi gen *tiGH*

Gen *tiGH* (*tilapia Growth Hormone*) diisolasi dari plasmid pMBA*tiGH* (Beta Aktin Medaka *tilapia Growth hormone*). Isolasi gen *tiGH* dilakukan dengan teknik digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Hasil digesti kemudian divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4.1.1.(1)).



Gambar 4.1.1.(1). Visualisasi hasil isolasi gen *tiGH* dari vektor pMBA

Hasil visualisasi digesti memperlihatkan tiga fragmen DNA yang masing-masing berukuran 4000 bp, 3500 bp an 830 bp. Fragmen DNA yang berukuran 4000 bp merupakan fragmen DNA yang menggambarkan ukuran promotor beta aktin medaka dan *Green Fluorescent Protein* (GFP). Sedangkan fragmen DNA yang berukuran 3500 bp merupakan fragmen DNA yang menggambarkan bagian dari SV40 PolyA. Fragmen DNA yang berukuran 830 bp merupakan bagian dari gen *tiGH*. Selanjutnya fragmen DNA yang berukuran 830 bp (Gambar 4.1.1.(1), lajur 1) diisolasi dan dipurifikasi dengan menggunakan *Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* [Geneaid]. Hasil isolasi dan purifikasi gen *tiGH* divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4.1.1.(2), lajur 1 dan 2).



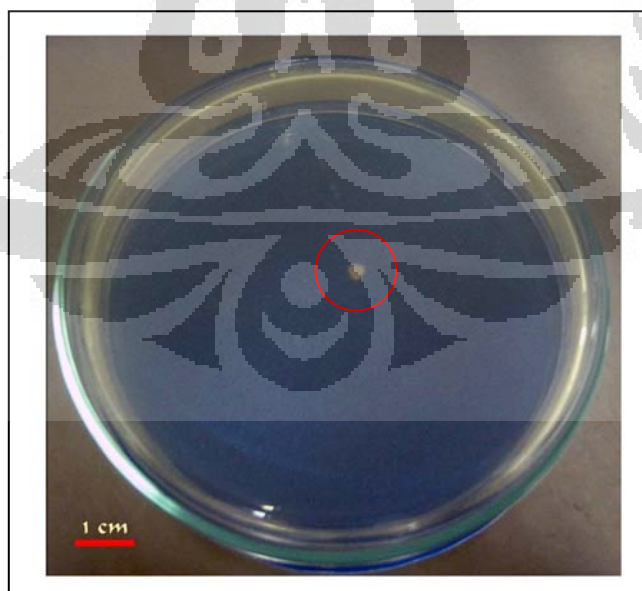
Gambar 4.1.1.(2) Visualisasi hasil purifikasi DNA *insert tiGH*

4.1.2 Ligasi DNA *insert* dengan vektor ekspresi pETBlue-2

Hasil purifikasi fragmen DNA *tiGH* dari gel digunakan sebagai DNA *insert* pada proses ligasi. Vektor ekspresi yang digunakan merupakan pETBlue-2 [Novagen]. Vektor ekspresi pETBlue-2 memiliki ukuran 3652 bp dan DNA *insert tiGH* berukuran 830 bp, sehingga menghasilkan vektor rekombinan berukuran 4482 bp. Hasil ligasi tidak divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa sebab langsung digunakan untuk proses transformasi.

4.1.3 Transformasi ke dalam *E. coli* novablue

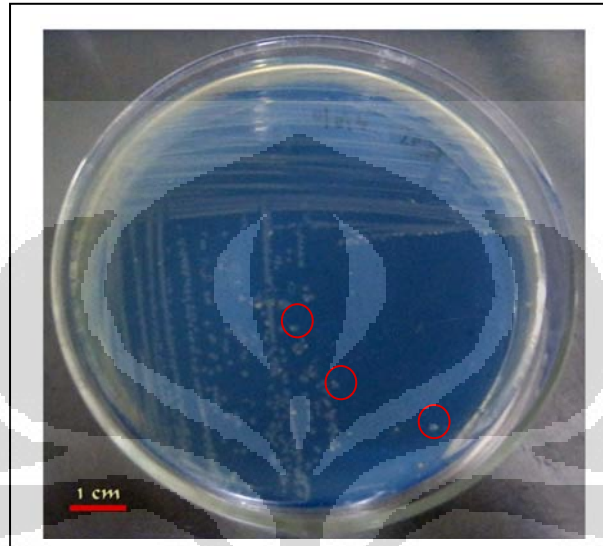
Hasil ligasi antara DNA *insert tiGH* dengan vektor ekspresi pETBlue-2 selanjutnya ditransformasikan ke dalam sel inang *E. coli* novablue. Proses transformasi ke dalam *E. coli* novablue menggunakan metode kejutan listrik atau elektroporasi. Metode tersebut memanfaatkan energi listrik dalam mengganggu kestabilan membran dinding sel. Transforman hasil transformasi yang tumbuh pada medium Luria Bertani(LB) padat dengan konsentrasi ampisilin sebesar 100 µg/ml berjumlah 1 koloni (Gambar 4.1.3).



Gambar 4.1.3 Hasil transformasi ke dalam sel *E. coli* novablue

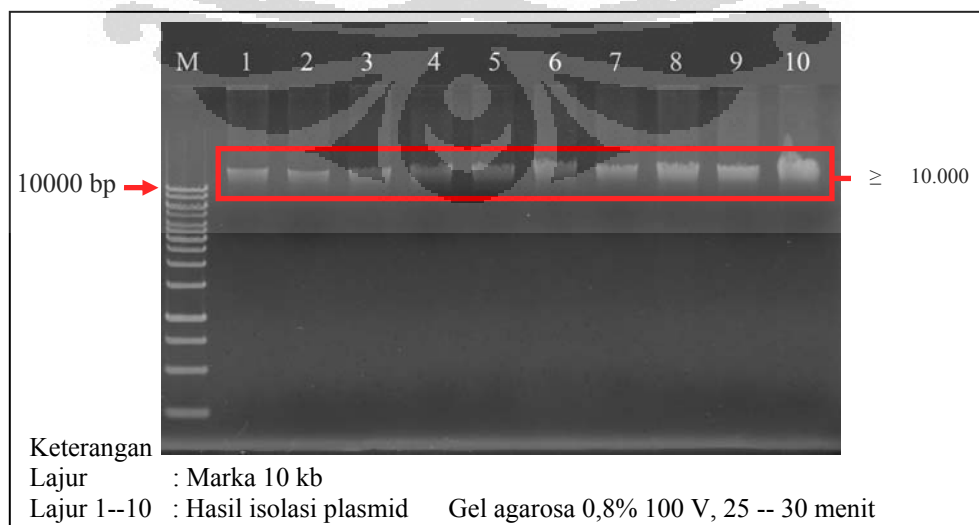
4.1.4 Isolasi plasmid hasil transformasi

Koloni putih tunggal yang tumbuh dalam medium seleksi diperbanyak dengan cara *streak* ulang ke dalam medium seleksi dengan konsentrasi ampisilin 100 µg/ml. (Gambar 4.1.4.(1)).



Gambar 4.1.4.(1) *Streak* ulang koloni hasil transformasi

Sebanyak sepuluh koloni hasil *streak* ulang kemudian ditumbuhkan ke dalam 4 ml Luria Bertani (LB) cair dalam tabung reaksi. Plasmid rekombinan hasil kultur diisolasi dengan metode *miniprep* *alkaline lysis solution* (Sambrook & Russell 2001: 1.31--1.34). Hasil isolasi plasmid kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (Gambar 4.1.4.2).



Gambar 4.1.4.2 Visualisasi hasil isolasi plasmid rekombinan

4.1.5 Pengukuran kemurnian dan konsentrasi vektor rekombinan

Kesepuluh sampel vektor rekombinan hasil isolasi plasmid dihitung konsentrasinya dan kemurniannya menggunakan *nano drop* (Tabel 4.1.5)

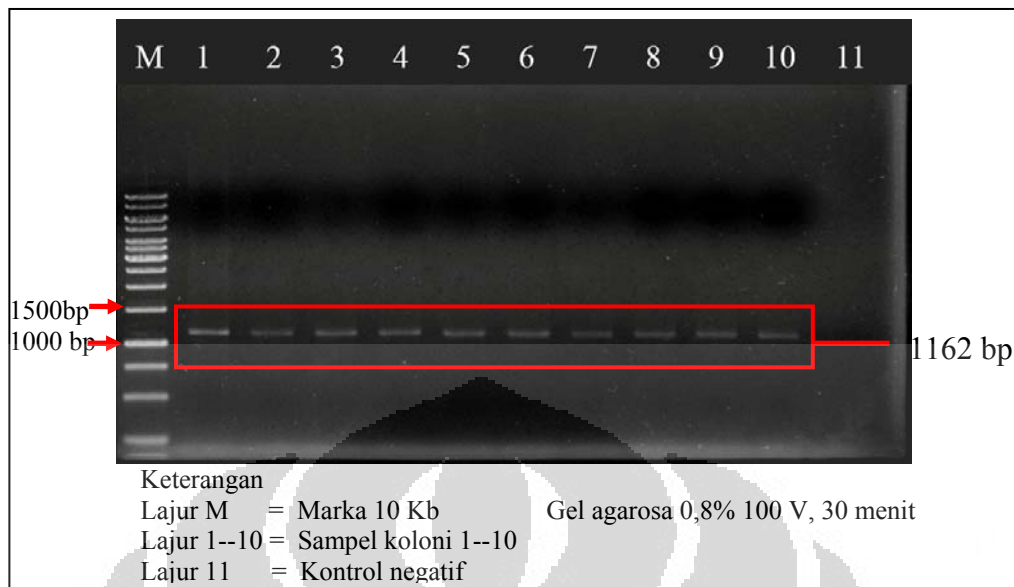
Tabel 4.1.5 Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian vektor rekombinan

No.	Sampel	Kemurnian ($A_{260/280}$)	Konsentrasi (ng/ μ L)
1	Sampel 1	1,12	4720,88
2	Sampel 2	1,59	4678,90
3	Sampel 3	1,23	4694,46
4	Sampel 4	1,38	4703,94
5	Sampel 5	1,22	4607,73
6	Sampel 6	1,35	4666,14
7	Sampel 7	1,29	4705,96
8	Sampel 8	1,28	4418,07
9	Sampel 9	1,33	4709,71
10	Sampel 10	1,18	3293,99

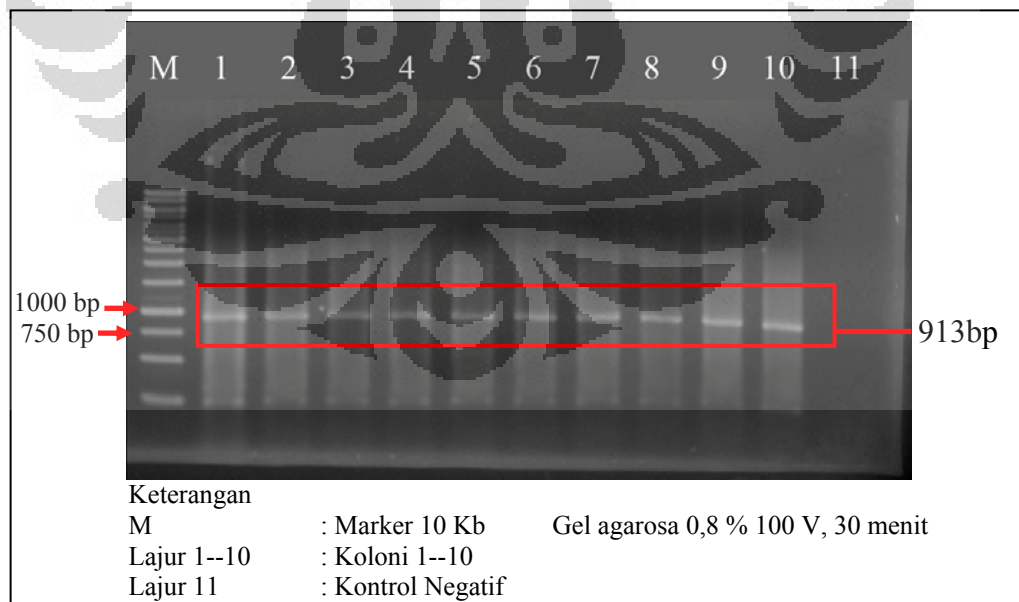
Hasil *nano drop* menunjukkan konsentrasi vektor rekombinan berkisar antara 3293,99--4720,88 ng/ μ l dengan kemurnian antara 1,12 --1,59. Hasil tersebut menunjukkan kemurnian vektor rekombinan menunjukkan bahwa DNA belum murni.

4.1.6 Verifikasi hasil isolasi plasmid dengan PCR

Sebanyak sepuluh sampel vektor rekombinan hasil isolasi plasmid diverifikasi menggunakan PCR. Verifikasi vektor rekombinan dilakukan dengan 2 kali PCR. Verifikasi PCR yang pertama untuk mengetahui keberadaan *insert tiGH*. Verifikasi PCR yang kedua untuk mengetahui orientasi *insert tiGH* terhadap vektor pETBlue-2. Hasil PCR *insert tiGH* (Gambar 4.1.6.(1)) dan Orientasi (Gambar 4.1.6.(2)) divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 0,8 %.

Gambar 4.1.6(1) Visualisasi hasil PCR *insert*

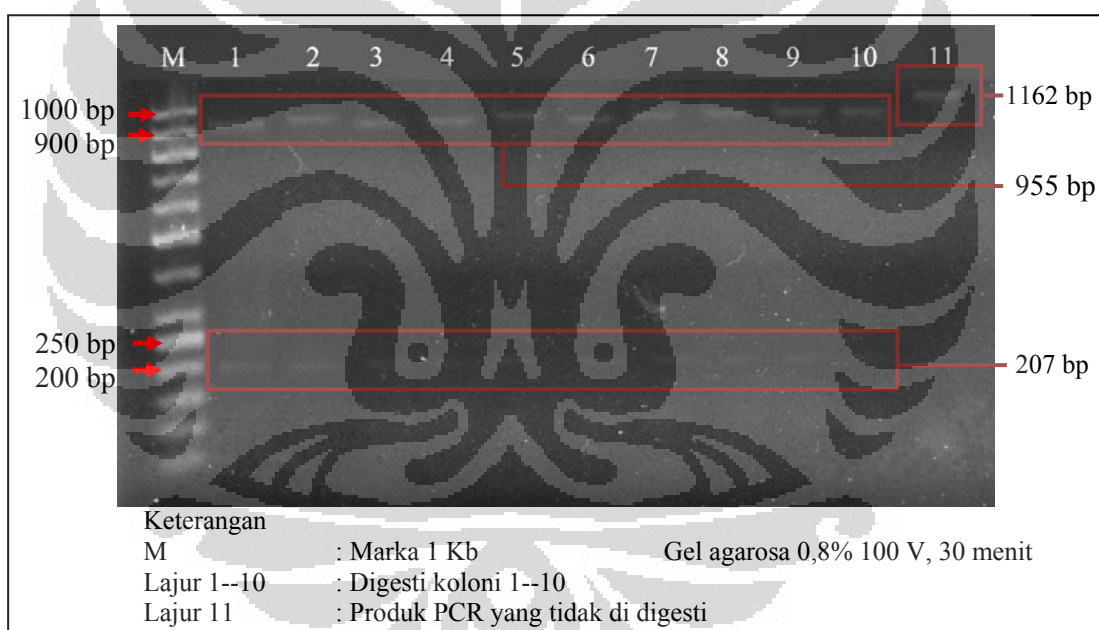
Hasil visualisasi menunjukkan kesepuluh sampel positif membawa fragmen DNA *tiGH* ditandai dengan munculnya pita dengan ukuran sekitar 1162 bp. Kontrol negatif (lajur 11) PCR tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, karena *template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah aquades yang tidak mengandung DNA *insert*.

Gambar 4.1.6(2) Visualisasi hasil PCR orientasi *insert tiGH* terhadap vektor

Hasil visualisasi menunjukkan kesepuluh sampel memiliki orientasi yang benar ditandai dengan munculnya pita dengan berukuran sekitar 913 bp. Kontrol negatif (lajur 11) PCR tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, karena *template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah aquades yang tidak mengandung DNA *insert*.

4.1.7 Verifikasi vektor rekombinan dengan digesti

Kesepuluh sampel hasil isolasi plasmid rekombinan kemudian diverifikasi dengan *EcoRI*. *Template* yang digunakan dalam proses digesti merupakan hasil produk PCR. Hasil digesti kemudian divisualisasikan dengan gel agarosa 0,8 % (Gambar 4.1.7)

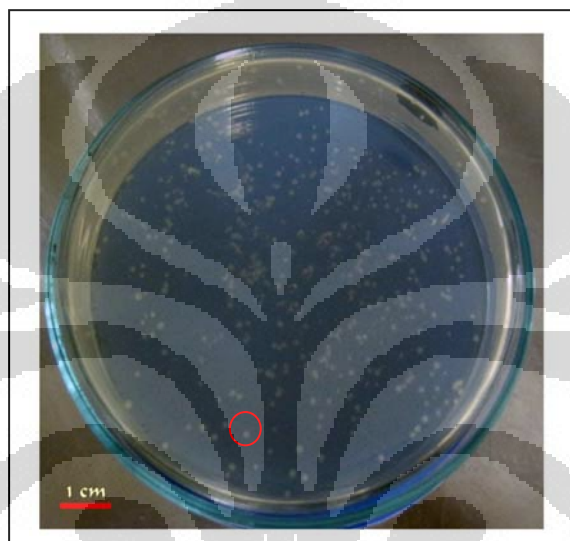


Gambar 4.1.7 Visualisasi hasil digesti dengan *EcoRI*

Hasil visualisasikan dengan eletroforesis gel agarosa 0,8 % menunjukkan 2 fragmen DNA berukuran 955 bp dan 207 bp pada Lajur 1--10. Hal tersebut menunjukkan sampel yang berhasil digesti. Lajur 11 merupakan kontrol berupa hasil PCR tanpa dilakukan digesti.

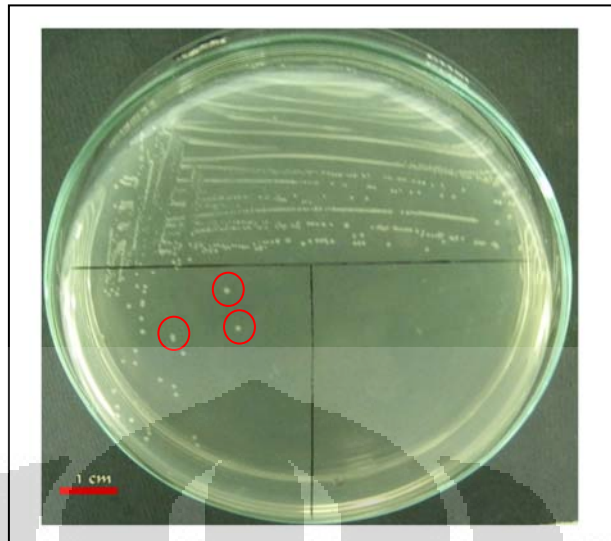
4.1.8 Transformasi ke dalam *E. coli* BL21

Transformasi ke dalam *E. coli* BL21 menggunakan sampel dua karena memiliki kemurnian yang paling tinggi dibandingkan dengan sampel yang lain (Tabel 4.1.5). Proses transformasi menggunakan metode kejutan listrik atau elektroporasi. Hasil transformasi ke dalam *E. coli* BL21 dapat dilihat pada Gambar 4.1.8(1)



Gambar 4.1.8(1) Hasil transformasi *E. coli* BL21

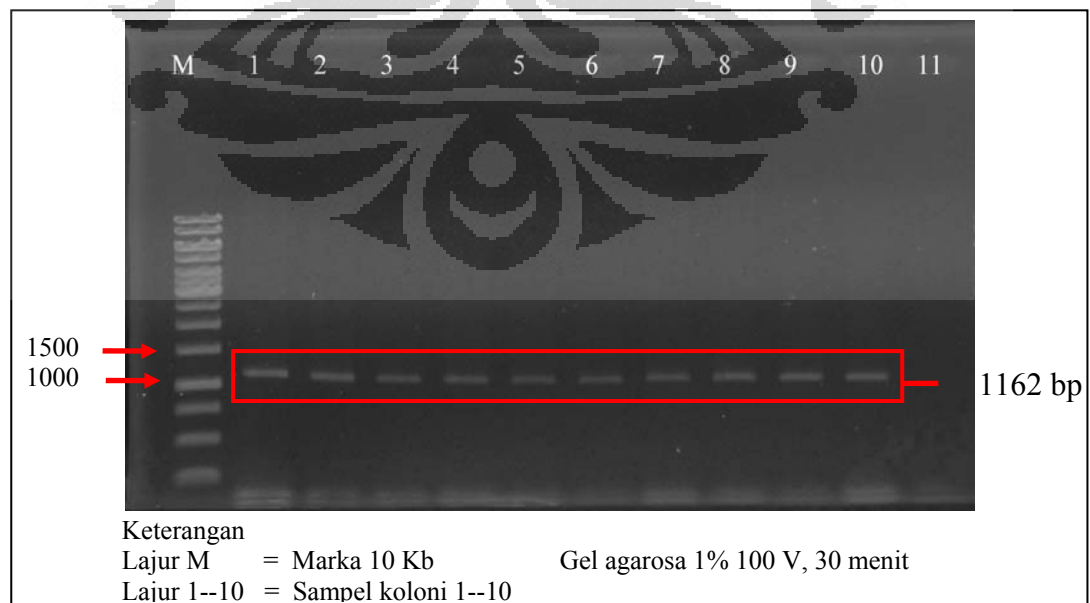
Hasil transformasi menghasilkan koloni berjumlah 526 koloni pada medium LB dengan konsentrasi ampisilin 25 µg/ml. Efisiensi transformasi ke dalam *E. coli* BL21 pada medium ampisilin 25 µg/ml adalah $1,12 \times 10^3$ cfu/µg. Koloni pada medium ampisilin 25 µg/ml diperbanyak dengan cara *streak* ulang ke dalam medium LB padat dengan konsentrasi sama dan di-*streak* pula pada medium dengan ampisilin lebih tinggi. Hasil *streak* ulang ke dalam medium LB padat dengan konsentrasi ampisilin 100 µg/ml



Gambar 4.1.8(2) Hasil *streak* ulang transformasi *E. coli* BL21

4.1.9 Verifikasi hasil transformasi ke dalam *E. coli* BL21

Sebanyak sepuluh koloni hasil *streak* ulang transformasi *E. coli* BL21 diverifikasi *insert tiGH* menggunakan PCR. Primer yang digunakan untuk mengetahui *insert tiGH* yaitu pETBlueUP dan pETBlueDOWN. Hasil visualisasi produk PCR koloni dengan elektroforesis gel agarosa 0,8 % (Gambar 4.1.9)

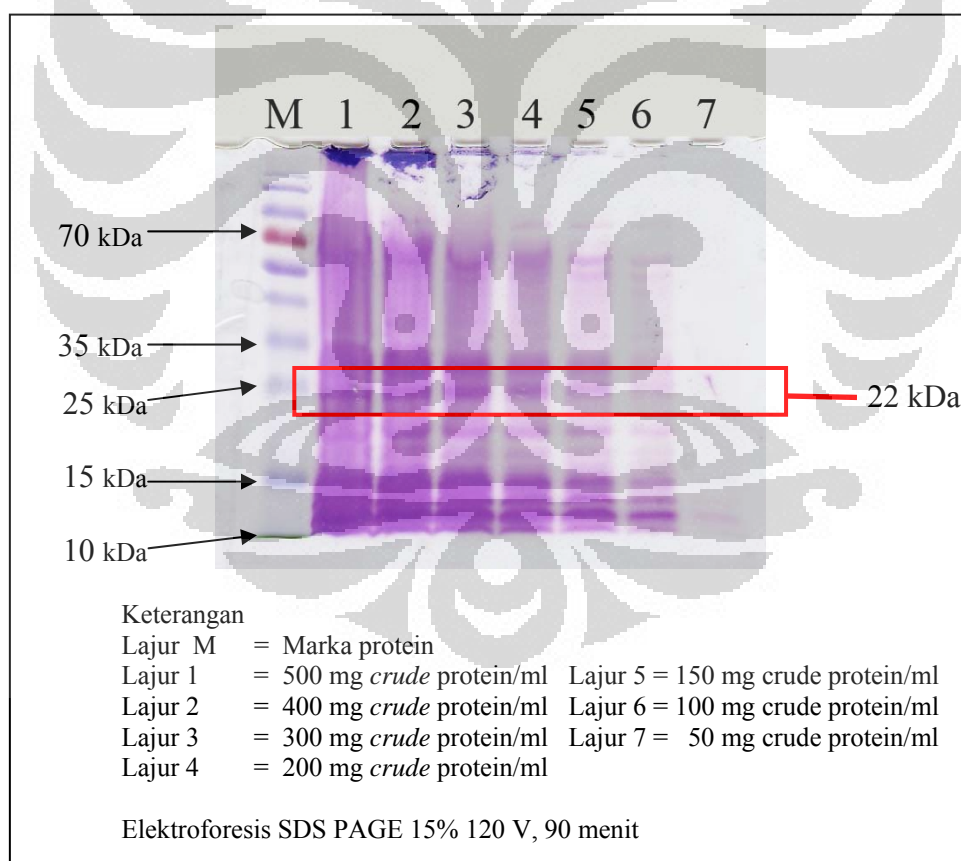


Gambar 4.1.9 Visualisasi hasil *insert tiGH* dengan PCR koloni

Hasil verifikasi menunjukkan 10 koloni positif dengan memperlihatkan fragmen ukuran 1162 bp. Lajur 11 merupakan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, karena *template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah aquades yang tidak mengandung DNA *insert*.

4.1.10 Ekspresi protein rekombinan tiGH

Sampel koloni nomer dua hasil *streak* ulang transformasi ke dalam *E. coli* BL21 positif hasil transformasi ke dalam BL21 yang telah diverifikasi dengan PCR dipilih untuk dikultur ekspresi protein rekombinan dengan induksi IPTG 0,4mM. Hasil visualisasi protein rekombinan tiGH dilakukan dengan SDS-PAGE sistem *discontinuous* yang menggunakan larutan *separating gel* 15% pH 8,8 dan larutan *stacking gel* 5% pH 6,8 (Gambar 4.1.10)

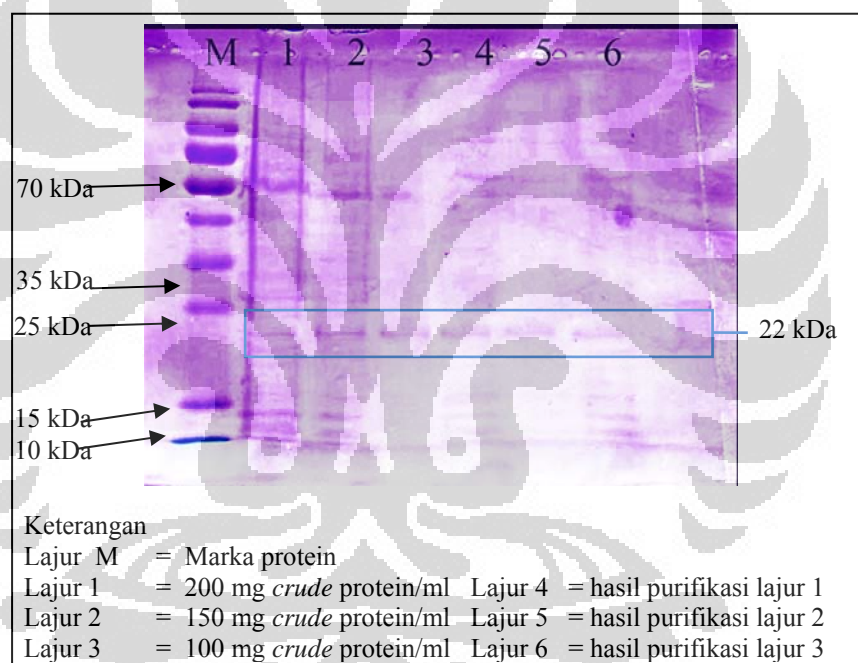


Gambar 4.1.10 Visualisasi SDS PAGE protein rekombinan tiGH

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari sampel protein dengan induksi IPTG menunjukkan adanya pita protein rekombinan tiGH (Gambar 4.1.10. lajur 1--7) dengan ukuran 22 kDa.

4.1.11 Purifikasi protein rekombinan tiGH

Hasil ekspresi protein tiGH kemudian dipurifikasi menggunakan metode filtrasi [Sephadex]. Hasil purifikasi divisualisasikan dengan SDS-PAGE sistem *discontinuous* yang menggunakan larutan *separating gel* 15% pH 8,8 dan larutan *stacking gel* 5% pH 6,8 (Gambar 4.1.11)



Gambar 4.1.11 Visualisasi purifikasi protein rekombinan tiGH

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari sampel protein menunjukkan lajur 1--3 muncul pita protein target berukuran 22 kDa dan masih banyak protein pengotor di tandai dengan munculnya pita protein dengan berbagai ukuran berat molekul. Hasil pada lajur 4--6 menunjukkan terdapat ukuran pita protein target berukuran 22 kDa dan pita protein lain dengan ukuran berat molekul yang lebih kecil dibandingkan dengan ukuran protein target.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi gen *tiGH*

Gen *tiGH* (*tilapia Growth Hormone*) diisolasi dari plasmid pMBA*tiGH* (Beta Aktin Medaka *tilapia Growth hormone*). pMBA*tiGH* telah dikonstruksi oleh Kobayashi *dkk.* (2007: 430). Proses digesti dilakukan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* (5'-G↓AATTC-3'). Enzim tersebut digunakan sebab pada peta konstruksi pMBA*tiGH* (Gambar 2.2), enzim *EcoRI* dapat memotong gen *tiGH* dari pMBA tanpa memotong gen *tiGH* (Kobayashi *dkk.* 2004: 560). Menurut Campbell *dkk.* (2002: 390), sifat dari enzim restriksi adalah spesifik, yaitu mengenali sekuen nukleotida pendek dalam molekul DNA dan memotong pada titik tertentu di dalam sekuen nukleotida tersebut. Hasil digesti menghasilkan 3 fragmen DNA dengan ukuran masing-masing sebesar 4000 bp, 3500 bp, dan 830 bp. Fragmen DNA yang berukuran 4000 bp merupakan fragmen DNA yang menggambarkan ukuran promotor beta aktin medaka dan *green fluorescent protein* (GFP). Sedangkan fragmen DNA yang berukuran 3500 bp merupakan fragmen DNA yang menggambarkan bagian dari SV40 PolyA. Fragmen DNA yang berukuran 830 bp merupakan bagian dari gen *tiGH*. Fragmen DNA berukuran 830bp kemudian diisolasi dan dipurifikasi menggunakan *Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* [Geneaid]. Prinsip kerja *Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit* [Geneaid] adalah purifikasi DNA menggunakan kolom penukar ion yang dapat memurnikan fragmen DNA dengan ukuran 100 bp --10.000 bp (Geneaid 2003: 1).

4.2.2 Ligasi DNA *insert tiGH* dengan vektor ekspresi pETBlue-2

Vektor ekspresi yang digunakan merupakan pETBlue-2 [Novagen]. Vektor ekspresi yang digunakan sudah dalam kondisi terpotong dengan ujung rata (*blunt end*) sehingga vektor ekspresi tidak perlu dipotong terlebih dahulu sebelum diligasi dengan DNA *insert tiGH*. Proses ligasi berdasarkan protokol *Perfectly Blunt[®] Cloning kits* (Novagen 2004: 9). Hasil ligasi tidak divisualisasikan dengan

elektroforesis gel agarosa. Hal tersebut disebabkan oleh konsentrasi DNA rekombinan yang terbentuk relatif sedikit.

Proses ligasi menggunakan *Perfectly Blunt*[®] *Cloning kits* memiliki beberapa keunggulan di antara dapat menyambung potongan DNA *insert* yang memiliki ujung rata (*blunt end*) maupun ujung tidak rata (*sticky end*) dan memiliki waktu ligasi yang cepat (Novagen 2004: 3). Potongan DNA *insert* yang berbentuk ujung tidak rata (*sticky end*) dapat menyambung dengan vektor yang memiliki potongan ujung rata (*blunt end*) disebabkan terdapat larutan *end conversion mix* (Novagen 2004: 15).

4.2.3 Transformasi ke dalam *E. coli* novablue

Transformasi ke dalam *E. coli* novablue bertujuan untuk memperbanyak salinan vektor rekombinan pETBlue-*tiGH*. Proses transformasi ke dalam *E. coli* novablue menggunakan metode kejutan listrik atau elektroporasi. Metode tersebut memanfaatkan energi listrik dalam mengganggu kestabilan membran dinding sel. Transformasi ke dalam *E. coli* novablue dengan elektroporasi pada penelitian menggunakan tegangan listrik sebesar 2.2 kV. Hal tersebut sesuai dengan BioRad (2000: 9) bahwa untuk transformasi menggunakan metode elektroporasi dengan bakteri tegangan aliran listrik yang optimal adalah sebesar 2.2 kV dengan satu kali aliran dalam kuvet yang memiliki ukuran celah sebesar 0.4 cm. Aliran listrik yang tidak tepat juga akan memengaruhi efisiensi transformasi dengan elektroporasi (Widodo *dkk.* 2002: 175).

Hasil transformasi ke dalam *E. coli* novablue berjumlah 1 koloni. Jumlah koloni yang sedikit diduga disebabkan oleh adanya kontaminasi protein, EDTA sehingga menghambat dalam proses ligasi. Kontaminasi tersebut bisa berasal dari proses purifikasi DNA *insert* (Novagen 2004: 22). Koloni tunggal hasil transformasi dapat tumbuh pada medium LB padat yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml. Menurut Sambrook & Russell (2001: 1.110) konsentrasi ampisilin yang dapat digunakan untuk seleksi yaitu 50--100 µg/ml. Bakteri *E. coli* novablue yang membawa vektor pETBlue-*tiGH* dapat tumbuh pada medium seleksi. Hal tersebut terjadi karena vektor pETBlue-2 memiliki gen

bla yaitu penanda resistan terhadap ampisilin (Amp^r). Gen *bla* yang terdapat pada vektor pETBlue-2 mengkode enzim β -laktamase. Enzim β -laktamase disekresikan ke dalam bakteri dan menghidrolisis antibiotik di sekitar medium, sehingga membentuk zona perlindungan yang mengakibatkan bakteri dapat tumbuh (Sambrook & Russell 2001: 1.148).

4.2.4 Isolasi plasmid hasil transformasi.

Hasil transformasi berupa koloni tunggal di-*streak* ulang ke dalam medium LB padat dengan konsentrasi ampisilin 100 $\mu\text{g/ml}$. Tujuan dilakukan hal tersebut untuk memperbanyak koloni putih yang dihasilkan. Koloni yang terbentuk ditumbuhkan ke dalam 4 ml LB cair. Plasmid rekombinan hasil kultur selanjutnya diisolasi dengan metode *minipreparation alkaline lysis solution*. Prinsip kerja isolasi plasmid dengan menggunakan metode *minipreparation alkaline lysis solution* adalah melisiskan dinding sel *E. coli* dan memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom sel *E. coli*. Metode tersebut terdiri atas tiga tahapan besar yaitu persiapan sel, proses lisis sel dan pemulihan DNA plasmid. Proses lisis sel dalam metode *alkaline lysis* menggunakan tiga (3) jenis larutan yang spesifik yaitu *solution I*, *solution II* dan *solution III* (Lampiran 4) (Sambrook & Russell 2001: 1.32—1.34). Hasil visualisasi menunjukkan ukuran pita diatas marker 1 Kb [Fermentas]. Hal tersebut diduga disebabkan bentuk plasmid hasil isolasi plasmid berbentuk sirkular sehingga menghambat pergerakan plasmid ketika dijalankan pada gel agarosa.

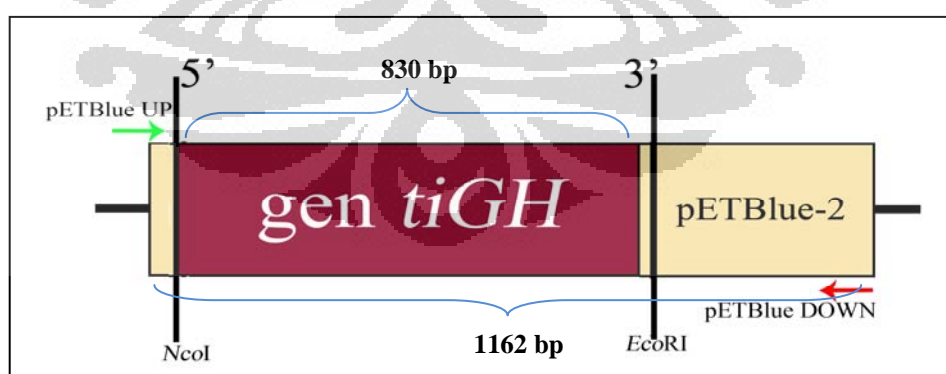
4.2.5 Pengukuran kemurnian dan konsentrasi vektor rekombinan

Hasil pengukuran kemurnian dan konsentrasi vektor rekombinan menggunakan *nano drop* menunjukkan sampel 1--10 memiliki konsentrasi berkisar antara 3293,99 -- 4720,88 $\text{ng}/\mu\text{l}$ dengan kemurnian antara 1,12 --1,59. Hal tersebut menunjukkan kemurnian vektor rekombinan menunjukkan bahwa DNA belum murni. Menurut Winfrey *dkk.* (1997: 56), kemurnian DNA harus berada pada kisaran nilai 1,8--1,9. Nilai kurang dari 1,8 menunjukkan adanya

kontaminasi protein. Kontaminasi protein dapat dihilangkan dengan melakukan purifikasi kembali DNA vektor rekombinan atau dengan pemberian proteinase. Menurut Walker & Rapley (2000: 28), proteinase dapat mendenaturasi protein yang mengkontaminasi. Purifikasi kembali tidak dilakukan, karena dikhawatirkan konsentrasi DNA vektor rekombinan yang didapat menjadi berkurang.

4.2.6 Verifikasi hasil isolasi plasmid dengan PCR

Hasil visualisasi verifikasi *insert* hasil isolasi plasmid dengan PCR menunjukkan kesepuluh sampel membawa fragmen DNA *insert* dengan ukuran sekitar 1162 bp. Kontrol negatif PCR tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, karena *template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah aquades yang tidak mengandung DNA *insert*. Kontrol tersebut diperlukan untuk mengetahui bahwa proses PCR berjalan dengan baik (Yuwono 2006: 23). Ukuran fragmen DNA menunjukkan terdapat penambahan sebesar 332 bp dari gen *insert tiGH* yang hanya sebesar 830 bp. Hal tersebut disebabkan verifikasi *insert tiGH* dengan PCR menggunakan primer yang berasal dari vektor yaitu pETBlueUP [Novagen] dan pETBlueDown [Novagen]. Gambar 4.2.6.(1) menunjukkan skema pelekatan primer pETBlue UP dan pETBlue Down yang menyebabkan terjadi penambahan sebesar 332 bp.



Gambar 4.2.6.(1) Pelekatan primer pETBlueUP dan pETBlueDOWN

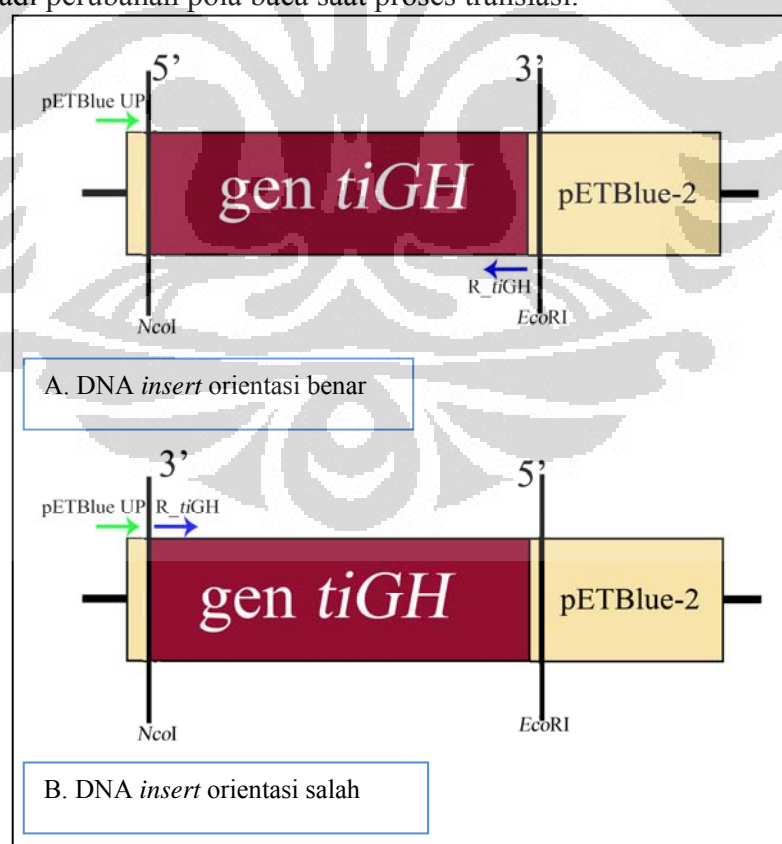
Primer pETBlueUP memiliki urutan basa sebagai berikut
5'TCACGACGTTGTAAAACGAC 3' dengan panjang sebanyak 20 basa dan

pETBlueDOWN memiliki sekuens basa 5'GTAAATTGCTAACGCAGTCA 3' dengan panjang primer sebanyak 21 basa. Komposisi G+C dari primer pETBlueUP dan primer pETBlueDOWN masing-masing adalah 45% dan 40%. Hal tersebut sesuai dengan Sambrook & Russell (2001: 8.8) bahwa penentuan kualitas primer dapat ditentukan dari beberapa faktor diantaranya komposisi basa, primer harus memiliki komposisi G+C sebanyak 40--60% dengan distribusi keempat basa disepanjang primer dan panjang primer harus terdiri dari 18--28 nukleotida.

Suhu denaturasi dan *annealing* yang digunakan dalam proses PCR dipengaruhi oleh kandungan basa C+G dan *temperature melting* (T_m) dalam primer yang digunakan. Suhu denaturasi yang digunakan dalam penelitian adalah 94°C. Menurut Sambrook & Russell (2001: 8.8), suhu denaturasi berkisar 94—96°C dapat digunakan pada primer dengan komposisi G+C kurang dari 55%. Komposisi G+C yang besar memerlukan suhu denaturasi yang lebih tinggi untuk merusak ikatan hidrogen antar basa. Primer pETBlueUP dan primer pETBlueDOWN masing-masing memiliki T_m sebesar 58 °C. Suhu *annealing* umumnya berkisar antara 3°—5 °C lebih rendah dari nilai T_m primer. Berdasarkan optimasi yang dilakukan di dapat suhu optimal yang digunakan dalam proses *annealing* sebesar 55 °C. Nilai T_m yang tinggi akan memerlukan suhu *annealing* yang tinggi pula. Akan tetapi, suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan penempelan primer tidak maksimal pada DNA target, sedangkan bila suhu terlalu rendah mengakibatkan berkurangnya spesifisitas primer saat menempel dengan sekuens DNA target yang akan di amplifikasi. Oleh karena itu, penting dilakukan optimasi untuk mendapatkan amplicon dari gen target yang tepat (Sambrook & Russell 2001: 8.8; Yuwono 2006: 18). Jumlah siklus dari PCR juga menentukan kualitas produk PCR yang dihasilkan.

Verifikasi PCR kedua untuk mengetahui orientasi *tiGH* terhadap vektor. Orientasi DNA *insert* pada vektor dapat diketahui dengan menggunakan primer yang merupakan bagian dari vektor dan primer yang merupakan bagian dari DNA *insert*. Primer yang merupakan bagian dari vektor adalah pETBlueUP, sedangkan R_*tiGH* merupakan primer bagian dari DNA *insert tiGH*. Hasil visualisasi PCR untuk mengetahui orientasi menunjukkan fragmen DNA berukuran 913 bp.

Ukuran fragmen tersebut merupakan ukuran *insert tiGH* yang memiliki orientasi benar pada vektor. Hasil PCR Orientasi yang tidak benar menunjukkan hal sebaliknya. Orientasi DNA *insert* yang tidak benar terhadap vektor, tidak menghasilkan produk PCR. Hal tersebut terjadi karena kedua primer melekat pada satu untai DNA, sehingga tidak terjadi amplifikasi. Orientasi DNA *insert* pada saat ligasi dengan vektor ekspresi pETBlue-2 memungkinkan menghasilkan dua orientasi (Gambar 4.2.6.2 a dan b). Hal tersebut terjadi karena pada proses ligasi hanya menggunakan satu situs restriksi, berupa situs *EcoRI* yang ada pada ujung-5' dan 3' dari DNA *insert*. Orientasi yang benar dapat menghasilkan protein rekombinan yang diinginkan. Orientasi DNA *insert* yang tidak benar terhadap vektor, dapat mengakibatkan tidak dihasilkannya protein rekombinan yang diinginkan saat ekspresi protein. Hal tersebut dapat terjadi karena sekuen nukleotida yang akan terbaca saat translasi tidak sesuai dengan yang seharusnya, karena menjadi terbalik. Menurut Ausubel *dkk.* (2002: 3.17.6), kesalahan orientasi DNA *insert* dapat menghasilkan protein rekombinan yang tidak sesuai karena terjadi perubahan pola baca saat proses translasi.



Gambar 4.2.6.(2) Orientasi *insert* terhadap vektor

4.2.7 Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti

Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti menggunakan *Template* yang berasal dari hasil produk PCR. Penggunaan produk PCR dalam digesti dilakukan sebab pada proses PCR *insert tiGH*, primer yang digunakan merupakan primer yang berasal dari vektor yaitu pETBlue UP [Novagen] dan pETBlue DOWN [Novagen] sehingga terdapat bagian dari vektor yang ikut teramplifikasi (Gambar 4.2.6.(1)). Bagian dari vektor yang ikut teramplifikasi tersebut terdapat situs penempelan enzim restriksi, salah satunya adalah enzim *EcoRI*. Menurut Campbell *dkk.* (2002: 390), sifat dari enzim restriksi adalah spesifik, yaitu mengenali sekuen nukleotida pendek dalam molekul DNA dan memotong pada titik tertentu di dalam sekuen nukleotida tersebut. *Template* memiliki bentuk linear sehingga ketika dilakukan digesti menggunakan enzim *EcoRI* terbentuk 2 pita dengan ukuran yaitu 955 bp dan 207 bp.

4.2.8 Transformasi ke dalam *E. coli* BL21

Transformasi ke dalam *E. coli* BL21 bertujuan untuk mengekspresikan protein rekombinan *tiGH*. Hasil transformasi menghasilkan koloni berjumlah 526 koloni pada medium LB dengan konsentrasi ampisilin 25 µg/ml. Proses transformasi kembali diulang agar menghasilkan koloni rekombinan yang dapat tumbuh pada medium yang lebih tinggi. Efisiensi transformasi ke dalam *E. coli* BL21 pada medium ampisilin 25 µg/ml adalah $1,12 \times 10^3$ cfu/µg (Lampiran 9). Efisiensi transformasi yang didapat tergolong rendah. Menurut Sambrook & Russell (2001: 1.25-1.26) Efisiensi transformasi menggunakan metode elektroporasi dapat mencapai antara 10^7 -- 10^9 transforman/µg DNA. Efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa-beberapa faktor antara lain teknik yang digunakan untuk membuat sel kompeten, sel yang digunakan, konsentrasi DNA, suhu dan waktu selama penyimpanan sel kompeten sebelum digunakan, dan medium kultur (Zhiming Tu *dkk.*2005: 116--119)

Koloni pada medium ampisilin 25 µg/ml diperbanyak dengan cara *streak* ulang ke dalam medium LB padat dengan konsentrasi sama dan di-*streak* pula

pada medium dengan ampisilin lebih tinggi. Hingga didapat bakteri yang dapat tumbuh pada konsentrasi ampisilin 100 µg/ml. Hal tersebut dilakukan sebab konsentrasi ampisilin yang dapat digunakan sebagai medium seleksi yaitu 50--100 µg/ml (Sambrook & Russell 2001: 1.110).

4.2.9 Verifikasi hasil transformasi ke dalam *E. coli* BL21 dengan PCR

Hasil visualisasi menunjukkan kesepuluh sampel membawa fragmen DNA dengan ukuran sekitar 1162 bp. Kontrol negatif PCR tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, karena *template* DNA yang digunakan dalam PCR adalah aquades yang tidak mengandung DNA *insert*. Kontrol tersebut diperlukan untuk mengetahui bahwa proses PCR berjalan dengan baik (Yuwono 2006: 23). Ukuran fragmen DNA menunjukkan terdapat penambahan sebesar 332 bp dari gen *insert tiGH* yang hanya sebesar 830 bp. Hal tersebut disebabkan verifikasi *insert tiGH* dengan PCR menggunakan primer yang berasal dari vektor yaitu pETBlueUP [Novagen] dan pETBlueDown [Novagen]. Gambar 4.2.6.1 menunjukkan skema pelekatan primer pETBlue UP dan pETBlue Down yang menyebabkan terjadi penambahan sebesar 332 bp.

4.2.10 Ekspresi protein rekombinan tiGH

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari sampel protein dengan induksi IPTG 0,4 mM menunjukkan adanya pita protein rekombinan tiGH dengan ukuran 22 kDa. Menurut Acosta *dkk* (2007: 1676) hormon pertumbuhan merupakan polipeptida yang dihasilkan oleh kelenjar pituitari dengan berat molekul 22 kDa. Penelitian lain mengenai hormon pertumbuhan di antaranya dilakukan yang oleh Acosta *dkk*. (2007: 1678) melaporkan telah berhasil melakukan ekspresi hormon pertumbuhan nila dengan menggunakan *Pichia pastoris* dengan berat molekul protein rekombinan sebesar 22 kDa. Tsai *dkk* (1995: 4119) melaporkan telah berhasil melakukan kontruksi GH dari yellowfin porgy (*Acanthopagrus Latus*) dengan berat molekul yang sama yaitu 22 kDa.

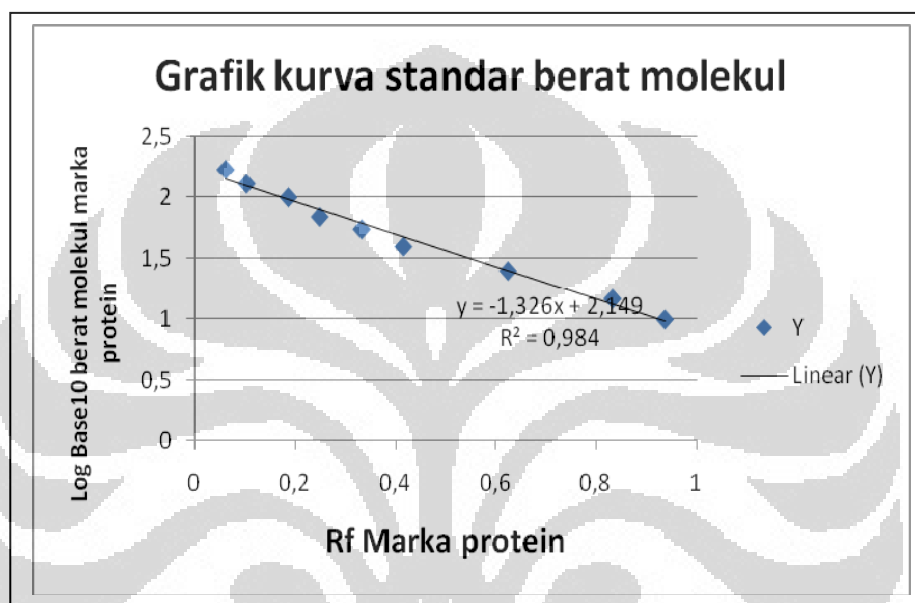
Mekanisme ekspresi *Growth hormone* dengan induksi IPTG dimulai dengan terikatnya IPTG pada situs pengikatan induser yang terdapat pada protein represor. Adanya kompleks induser (IPTG)-represor menyebabkan terjadinya perubahan struktural pada situs pengikatan protein represor dengan situs pengikatan represor pada operator. Hal tersebut menyebabkan tidak adanya interaksi yang terjadi antara protein represor dan operator, sehingga memungkinkan RNA polimerase sel inang yang telah berikatan dengan promoter dapat memulai transkripsi dan translasi menjadi hormone pertumbuhan.

Hasil Ekspresi protein rekombinan tiGH dilakukan dengan SDS-PAGE sistem *discontinuous* yang menggunakan larutan *separating gel* 15% pH 8,8 dan larutan *stacking gel* 5% pH 6,8. Semakin kecil ukuran pori-pori gel akrilamid maka konsentrasi akrilamid yang digunakan harus ditingkatkan (Gallagher 1995: 10.1.1). Larutan yang digunakan dalam membuat gel umumnya mengandung Tris-HCl, akrilamid, amonium persulfat, TEMED, dan H₂O, serta ditambahkan dengan SDS 10% (Gallagher 1995: 10.1.12). Proses pewarnaan SDS PAGE menggunakan *Coomassie Brilliant Blue Staining R-250*. Pewarnaan tersebut memberikan warna biru pada seluruh gel. *Coomassie blue staining* yang bermuatan negatif akan berikatan dengan protein yang bermuatan positif melalui interaksi elektrostatis. Gel yang telah diwarnai dengan *Coomassie blue staining* selanjutnya direndam dalam larutan *destaining solution* yang mengandung asam asetat, metanol, dan akuades. Perendaman dalam larutan *destaining solution* berfungsi untuk menghilangkan warna biru yang terdapat pada latar belakang gel, namun tetap memertahankan warna biru pada pita-pita protein karena adanya ikatan yang lebih kuat.

4.2.11 Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan tiGH secara manual dari hasil SDS-PAGE

Analisis perhitungan berat molekul protein rekombinan tiGH dapat diketahui dan diperkirakan secara manual dari hasil SDS-PAGE, melalui persamaan garis linier dari kurva standar marka protein (Gambar 4.2.11). Perhitungan berat molekul diawali dengan membandingkan nilai mobilitas relatif

(Rf) dari protein rekombinan tiGH dengan nilai Rf protein standar yang telah diketahui berat molekulnya. Nilai Rf merupakan nilai yang diperoleh dengan cara membagi jarak migrasi pita protein dengan jarak migrasi larutan pada bagian bawah gel, sedangkan nilai logaritma berat molekul protein standar diperoleh dengan cara menghitung nilai logaritma masing-masing dari berat molekul protein standar yang digunakan. (Gallagher 1995: 10.1.30).



Gambar 4.2.11 Kurva standar berat molekul marka protein

Persamaan garis linier akan didapatkan dari kurva standar yang diperoleh dengan cara memasukkan nilai Rf (X) dan nilai logaritma berat molekul (Y). Nilai logaritma berat molekul protein rekombinan tiGH didapatkan dengan cara memasukkan nilai Rf sampel ke dalam persamaan linier dari kurva standar yang telah diperoleh (Gambar 4.2.11). Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan bahwa berat molekul protein rekombinan tiGH adalah sebesar ~22,2 kDa atau ~22 kDa (Lampiran 10).

4.2.12 Purifikasi protein rekombinan tiGH

Hasil visualisasi pada lajur 1-3 berupa sampel protein dengan berbagai konsentrasi yang belum dilakukan purifikasi menunjukkan muncul banyak pita protein dengan berbagai ukuran diantaranya 55 kDa, 32 kDa, 22 kDa, dan 12 kDa.

Pita protein berukuran 22 kDa merupakan ukuran berat molekul protein tiGH (Acosta *dkk.* 2007: 1676). Lajur 4-6 merupakan sampel protein yang telah mengalami proses purifikasi, hasil visualisasi menunjukkan pita protein yang terlihat lebih sedikit yaitu 22 kDa dan 12 kDa. Ukuran protein yang lebih besar dari 22 kDa tidak terlihat. Metode yang digunakan untuk purifikasi adalah metode gel filtrasi *ion exchange*. Metode tersebut akan menangkap protein berukuran besar dan meloloskan protein dengan ukuran yang lebih kecil (Amersham Bioscience: 1998: 2). Hal tersebut yang menyebabkan sampel protein hasil purifikasi lebih sedikit pita protein yang muncul dibandingkan dengan sampel yang belum dipurifikasi.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Gen *tiGH* telah berhasil diklona ke dalam vektor ekspresi pETBlue-2 dalam sel *E. coli* BL21 dan telah dilakukan ekspresikan serta purifikasi menjadi protein rekombinan *growth hormone* dengan berat molekul sebesar 22 kDa.

5.2 Saran

Perlu dilakukan uji aktivitas protein rekombinan *growth hormone* terhadap ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

DAFTAR REFERENSI

- Acosta J, R. Morales, A. Morales, M. Alonso, & P.M. Estrada, 2007. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotchenol* **29**: 1671--1676
- Amersham Biosciences. 1998. *Desalting and buffer exchange with Sephadex® G-25*. Wikstroms. Sweden. 8 hlm.
- Amri, K & Khairuman. 2008. *Budidaya ikan nila secara intensif*. Agromedia pustaka. Jakarta: x + 146 hlm.
- Anderson, K.L. & G. Purdom. 2009. Analysis of Barry Hall's research of the *E. coli* ebg operon: Understanding the implications for bacterial adaptation to adverse environments. 3 Juni: 26 hlm.
<http://www.answersingenesis.org/articles/aid/v4/n1/analysis-of-barry-halls-research>. 23 September 2011, pk. 14.00 WIB.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology*. 5nd ed. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xxxviii + 12.10 + A1-29 + 17 hlm.
- BioRad. 2000. *Micropulser™ electroporation apparatus operating instructions and application guide*. BioRad Laboratories, United States: 1—31 hlm.
- Boyer, R.F. 1993. *Modern experimental biochemistry*. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Pacific Groove: xix + 820 hlm
- Brooker, R.J. 2005. *Genetics: Analysis and principles*. McGraw-Hill, New York: xxii + 842.
- Brown, T.A. 1987. *Gene Cloning an introduction*. Van Nostrand Reinhold Co.Ltd., Wokingham: vi + 233 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Ed. ke-5. Terj. dari *Biology*. 5th ed, oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo, & W. Manalu. Penerbit Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Caprette, D.R. 2005. Introduction to SDS-PAGE. 24 Mei: 2 hlm.
<http://www.raf.rice.edu/~biolabs/studies/sds-page/gella2.html>.
3 Agustus 2011, pk. 16.58 WIB.

- Davis, L.G., W.M. Kuehl & J.F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwlk: xiii + 763 hlm.
- Fairbanks, D.J & W.R. Andersen. 1999. *Genetics the continuity of life*. Wadsworth Publishing ompany, New York: xiii + 438 hlm.
- Fermentas. 2006. *Molecular biology catalog & product application guide*. Fermentas Inc., Hanove: x + 453 hlm.
- Gallagher, S.R. 1995. One-dimentional SDS gel electrophoresis protein. *Dalam*: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher & P.T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey & Sons, Inc., Washington: 10.1.1--10.1.34.
- Geneaid. 2003. *Gel/PCR DNA fragments extraction kit*. Sci, USA: 3 hlm.
- IT IS (=Integrated Taxonomic Information System). 2011. *Oreochromis niloticus*. Februari 2011: 1 hlm.
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=688444, 20 Februari 2011, pk. 13.00.
- KKP (=Kementrian Kelautan dan Perikanan). 2011. *Produksi Ikan Ditargetkan 10 Juta Ton pada 2011*: 3 hlm
<http://www.kkp.go.id/index.php/arsip/c/21942/Produksi-Ikan-Ditargetkan-10-Juta-Ton-pada-2011/>, 20 November 2011, pk. 13.00
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Kobayashi,S., Alimuddin, T.Morita,M. Miwa,J. Lu, M. Endo, T. Takeuchi, & G. Yoshizaki 2007. Transgenic Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Over Expressing Growth Hormone show Reduced Amonia Excretion. *Aquacult* **270** : 427- 435
- Kordi, M. G. H. 2010. *Budidaya ikan nila di kolam terpal*.lily publisher. Yogyakarta: xvi + 112 hlm.
- Leonard, D., Kuehl, & J. Battley. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appletown & Lange Norwalk, Connecticut: xiv + 777hlm.
- Li WS, Chen D, Wong AOL & Lin HR. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *J. Endocrinol.* 78-89.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings publishing Inc., San Francisco: xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + I-36 hlm.
- Matty A.J. 1985. *Fish endocrinology*. Croom Helm London and Sydney Timber Press. Portland, Oregon. 267 p.
- MolekularHub. 2011. 5 Factors affecting gene cloning efficiency. **3 hlm**
<http://molekularhub.com/5-factors-affecting-gene-cloning-efficiency/>. 20 November 2011. Pk 13.45
- Novagen. 2004. *pETBlue Perfectly Blunt Clonning Kit*. Darmstadt, Jerman: 17 hlm.
- Novagen. 2006. *pET system manual*. Darmstadt, Jerman: 80 hlm
- Pierce Biotechnology. 2009. Thermo scientific Pierce Cell lysis technical handbook: Featuring cell lysis reagent and detergent. Thermo Fisher Scientific, Inc., United States: 50 hlm.
- Prihatman, K. 2000. *Budidaya ikan nila*. Maret 2000. 14 hlm.
<http://www.warintek.ristek.go.id/perikanan/air%20tawar/nila.pdf>. 23 Maret 2011, pk. 19:20.
- Promdonkoy B., J.Warit, & S.Payim. 2004. Production of a biologically active growth hormone from giant catfish(*Pangasianodon gigas*) in *Escherichia coli*. *Biotech let* **26** : 649 –653
- Rentier-Delrue,F., Swennen,D., Philippart,J.C., L'Hoir,C., Lion,M.,Benrubi,O, and Martial,J.A. 1989. Tilapia growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *Dna Mary Ann Liebert Inc* **8**: 271-278
- Rukmana, R. 2007. *Ikan nila budidaya dan prospek agribisnis*. Kanisius. Yogyakarta: xi + 91 hlm
- Sambrook, J., E. F. Fritsch., & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxviii + 7.87 hlm + I.47.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 1--3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + R.22 + I.44 hlm.

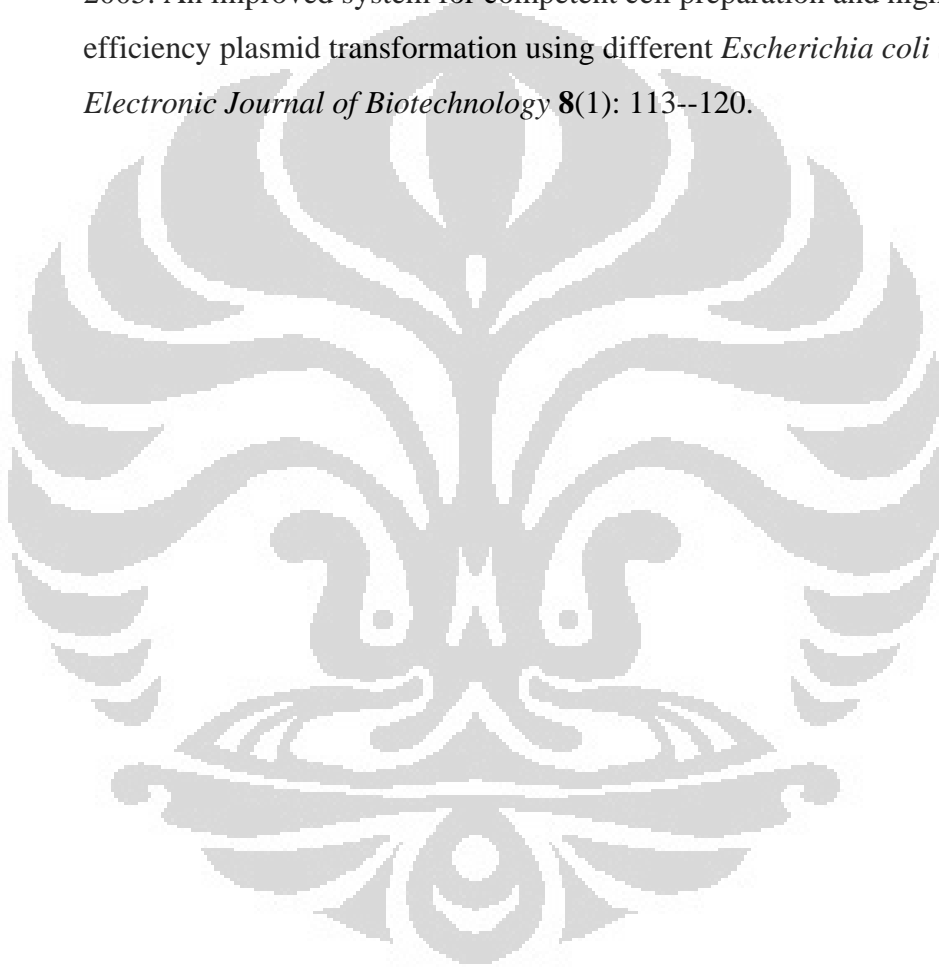
- Seidman, L.A. & C.J. Moore. 2000. *Basic laboratory methods for biotechnology: Textbook and laboratory reference*. Prentice Hall, Inc., London: vi + 751 hlm.
- Sjahril, R. 2008. *Aplikasi konsep teknologi DNA rekombinan pada transfer genetik tanaman*. Universitas Hasanuddin, Makassar: vii + 73 hlm
- Snustad, D.P. & M.J. Simmons. 2003. *Principles of genetics*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: xix + 840 hlm.
- Stratagene. 2004. BL21 (DE3) *competent cells*, BL21 (DE3) pLysS *competent cells*, and BL21 *competent cells*, Stratagene, California: 15 hlm.
- Tamarin, R.H. 2002. *Principles of genetics*. 7th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xvi + 609 hlm.
- Tsai.H.J., K.L. Lin., J.C Khuo., & S.W.Chen. 1995. Highly Efficient Expression of Fish Growth Hormone by *Escherichia coli* Cells . *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4166-- 4119
- Twyman, R.M. 1998. *Advanced molecular biology*. BIOS Scientific Publishers, New York: xi + 499 hlm.
- Vierstraete, A. 1999. Priciple of the PCR. (?): 1 hlm.
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, 20 Oktober 2011, pk. 14.24.
- Walker, J.M. & R. Rapley. 2000. *Molecular biology and biotechnology*. 4th ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: xxiv + 563 hlm.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski & M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, New York: xiv + 626 hlm.
- Weaver,R. 2002. *Molecular Biology*.2th ed.McGrawHill, New York . 679 hlm
- Widodo. 2002. Pengaruh tegangan elektroporasi terhadap efisiensi transformasi plasmid PND 968 bakteri asam laktat ke *E.coli* HB101. *Jurnal teknol. Dan industri pangan.* **8**:173-178
- Winfrey, M.R., M.A. Rott, & A.T. Wortman. 1997. *Unraveling DNA: molecular biology for the laboratory*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: xxviii + 369 hlm.
- Wong, D.W.S. 1997. *The ABC of gene cloning*. International Thomson

Publishing, New York: xiv + 213 hlm.

Yuwono, T. 2005. *Biologi molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.

Yildir, C., Z.I. Onsan & B. Kirdar. 1998. Optimization of starting time and period of induction and inducer concentration in production of the restriction enzyme *EcoRI* from recombinant. *Turk. J. Chem.* **22**: 221--226.

Zhiming Tu, Guangyuan He, Kexiu X. Li, Mingjie J. Chen, Junii Chang, Ling Chen, Qing Yao, Dongping P. Liu, Huan Ye, Jiantao Dhi, & Xuqian Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**(1): 113--120.



Lampiran 1

Komposisi dan cara pembuatan larutan dan *buffer*

Larutan/ <i>buffer</i>	Cara pembuatan
Marka 1 kb <i>Ladder</i>	50 μ l <i>stock</i> 1 kb <i>Ladder</i> ditambah 950 μ l Tris-EDTA untuk menjadikan konsentrasi akhir 50 ug/ μ l
<i>Loading dye</i> 6x	Bromofenol biru 0,03%, Tris-HCL 10mM (pH 7,6), gliserol 60%, EDTA 60mM, dan <i>xylene cyanol</i> dilarutkan dalam akuades.
<i>Solution I</i>	Sebanyak 5 ml glukosa 1M dicampur dengan Tris-Cl pH 8 1M dan EDTA 0.05M pH 8 kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, disimpan pada suhu 4°C
<i>Solution II</i>	Sebanyak 150 μ l NaOH 10M dicampur dengan 300 μ l SDS 10% kemudian ditambah akuades hingga volume 1,5 ml, dan disimpan ke dalam <i>freezer</i> 4°C. Larutan II disiapkan dalam keadaan segar
<i>Solution III</i>	Sebanyak 60 ml <i>potassium asetat</i> 5M dicampurkan dengan 11.5 ml asam asetat glasial kemudian ditambah akuades hingga volume akhir 100 ml dan disimpan pada suhu 4°C
Gel agarosa 1%	Sebanyak 0.5 g bubuk agarosa dilarutkan dengan 50 ml TBE lalu dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih.
0,5 μ l/ml Etidium bromida	Sebanyak 10 μ l etidium bromida (10 mg/ml) dilarutkan dengan 200 ml akuades.
Antibiotik ampisilin 100 mg/ml	Sebanyak 0.5 g bubuk ampisilin ditambahkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 5 ml dan disimpan dalam suhu -20°C
TBE 10x	Sebanyak 60,55 g <i>Tris-base</i> , 30,92 g asam borat, dan 3,72 g EDTA dilarutkan dengan 100 ml akuabides, kemudian ditambahkan dengan akuabides 400 ml

(Lanjutan)

TBE 1x	Sebanyak 360 ml akuabides ditambahkan dengan 40 ml TBE 10x, kemudian diaduk perlahan sampai homogen
<i>Running buffer</i> SDS PAGE	Sebanyak 12 g <i>tris-base</i> , 57,6 g Glisin dicampurkan dengan akuabides sebanyak 500 ml sampai campuran larut. Sebanyak 10 ml SDS 10% ditambahkan pada campuran kemudian ditambahkan akuabides sampai volumenya 1 liter
<i>Destaining solution</i>	Sebanyak 100 ml asam asetat glasial dicampurkan dengan 400 ml metanol. Campuran kemudian ditambahkan dengan H ₂ O sampai 1.liter
<i>Loading buffer</i> SDS PAGE	200 µl 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) dicampurkan dengan 1,2 ml SDS 10%, 690 µl Gliserol 87%, Bromophenol blue dan 2 M DDT serta ddH ₂ O hingga 6 ml
<i>Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution</i> 0,2% (100 ml)	0,2 g <i>commasie brilliant blue</i> dicampurkan dengan 7,5 ml asam asetat glasial dan 40 ml metanol. Semua bahan yang telah dicampur ditambahkan H ₂ O sampai 100 ml
<i>Lysis buffer</i>	Sebanyak 7,8 g sodium laurat sulfat, 4,35 g NaCl, 5 ml Triton-x, dan 5 ml Tris-Cl 1M dicampurkan dengan H ₂ O sampai volumenya 500 ml.

[Sumber : Sambrook *dkk.* 1989. A1-B22]

Lampiran 2
Komposisi reaksi digesti menggunakan *EcoRI*

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	5,5
10x <i>buffer EcoRI</i>	1
Enzim <i>EcoRI</i>	0,5
Sampel	3
TOTAL	10

[Sumber: Fermentas. 2006: 216.]

Lampiran 3
Komposisi reaksi ligasi pETBlue-2 dan *tiGH*

Bahan	Volume (μL)
ddH ₂ O	2
DNA <i>insert</i>	3
<i>End conversion mix</i>	5
<i>Blunt vector</i>	1
T4 DNA ligase	1
TOTAL	12

[Sumber: Novagen 2004: 12]

Lampiran 4
Komposisi larutan dalam isolasi plasmid.

Nama larutan	Komposisi
<i>Solution I</i>	50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl, dan 10 mM EDTA.
<i>Solution II</i>	0.2 M NaOH dan 10 % SDS (Sodium Disulfat)
<i>Solution III</i>	M CH ₃ COOK (Kalium Asetat), CH ₃ COOH (asam asetat) pekat, dan akuades

[Sumber : Sambrook *dkk.* 1989. A1-B22]

Lampiran 5
Primer yang digunakan dalam penelitian

Nama Primer	Sekuens	Ukuran pita hasil amplifikasi
pETBlue UP	5'TCACGACGTTGTAAAACGAC 3'	1162 bp
pETBlue DOWN	5'GTTAAATTGCTAACGCAGTCA 3'	
R_tiGH	5' CCAGGACTCAACCAGTCCAT 3'	913 bp

[Sumber: Novagen 2004: 14]

Lampiran 6
Komposisi reaksi PCR untuk verifikasi *insert tiGH*

Bahan	Volume (μ L)
ddH ₂ O	6
primer pETBlue UP	0,5
Primer pETBlue DOWN	0,5
2 mM dNTP	1
10x <i>buffer</i> DNA <i>Taq</i> polymerase	1
5u/ μ L <i>Taq</i> polymerase	0,1
Sampel DNA	1
TOTAL	10

[Sumber: Sambrook & Russell 2001: 8.21.]

Lampiran 7
Program PCR untuk verifikasi *insert* dan orientasi

Segment	Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus	Gradien
1	Denaturasi	94 °C	1 menit	-	-
2	<i>Annealing</i>	48 °C	1 menit	35	10
3	Elongasi	72 °C	2 menit	35	-
4	Pasca elongasi	72 °C	5 menit	35	
4	Preservasi	4 °C	∞	-	-

[Sumber: Novagen 2004 : 54]

Lampiran 8
Komposisi dan volume reaksi yang digunakan dalam pembuatan gel Poliakrilamid

	Bahan	Volume (ml)
15 % Separating gel	H ₂ O steril	3,22
	Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)	3,50
	Akrlamid 30 %	7,00
	SDS 10%	0,14
	Amonium Persulfat 10%	0,14
	TEMED	0,005
	5% Stacking Gel	H ₂ O steril
Tris HCl 1,5 M (pH 6,8)		0,63
Akrlamid 30 %		0,83
SDS 10%		0,14
Amonium Persulfat 10%		0,14
TEMED		0,005

[Sumber : Sambrook *dkk.* 1989. A1-B22]

Lampiran 9
Perhitungan efisiensi transformasi pada *E. coli* BL21

Tujuan:

Mengetahui efisiensi transformasi pada *E. coli* BL21

Rumus:

$$\text{Efisiensi Transformasi} = \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{pengenceran} \times \text{vol. Total transformasi}}{\text{Vol. Yang di-spread} \times \text{konsentrasi}}$$

Perhitungan:

Jika diketahui: Jumlah koloni = 526 volume spread = 100 μl
 Konsentrasi plasmid = 4,6789 μg volume total = 1000 μl

$$\text{Maka efisiensi transformasi} = \frac{526 \times 1 \times 1000 \mu\text{l}}{100 \mu\text{l} \times 4,6789 \mu\text{g}}$$

$$1,12 \times 10^3 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

[Sumber: Zhiming Tu *dkk.* 2005: 117.]

Lampiran 10

Perhitungan berat molekul protein rekombinan Growth hormone hasil SDS PAGE

Berat molekul marka protein (kDa)	Jarak pita protein dari atas gel	R _f (X)	Log base 10 dari berat molekul
170	0,3	0,062	2,23
130	0,5	0,104	2,11
100	0,9	0,187	2,00
70	1,2	0,250	1,84
55	1,6	0,333	1,74
40	2	0,416	1,60
25	3	0,625	1,40
15	4	0,833	1,17
10	4,5	0,937	1

Jarak migrasi larutan = 4,8 cm

Panjang pita sampel dari bagian atas separating gel sebesar 2,9 cm

R_f (x) sampel sebesar 0,604

Kurva standar (Gambar 5.1.) dari R_f (x) vs Log MW (y) menghasilkan persamaan kuadrat: $y = -1,326x + 2,149$

berdasarkan persamaan kuadrat tersebut maka diperoleh

$$Y (\text{Log MW}) = y = -1,326(0,604) + 2,149 = 1,3480$$

$$\text{MW} = 22,28$$

Kesimpulan: protein rekombinan Growth hormone mempunyai berat molekul sebesar ~ 22 kDa

[Sumber: Gallagher 1995: 10.1.30.].