



IDENTIFIKASI MARKA MOLEKULER TERKAIT KELAMIN PADA UDANG GALAH (*Macrobrachium rosenbergii*)

NOVI MEGAWATI



ILMU AKUAKULTUR
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2020

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul “Identifikasi Marka Molekuler Terkait Kelamin pada Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*)” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2020

Novi Megawati
NIM C151170021

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



RINGKASAN

NOVI MEGAWATI. Identifikasi Marka Molekuler Terkait Kelamin pada Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*). Dibimbing oleh ALIMUDDIN dan RATU SITI ALIAH.

Udang galah jantan lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan betinanya, karenanya budidaya udang galah monoseks jantan menjadi salah satu solusi untuk meningkatkan produksi budidaya. Budidaya monoseks jantan dapat menghasilkan produksi yang lebih baik sekitar 63,13 % dibandingkan dengan populasi campuran. Hal tersebut terjadi karena energi yang digunakan hanya difokuskan untuk pertumbuhan somatik. Populasi monoseks jantan udang galah dapat dihasilkan dengan mengawinkan *neofemales* (*sex-reversed males*) dengan jantan normal. Uji progeni biasa dilakukan dalam proses produksi monoseks jantan, akan tetapi identifikasi kelamin dilakukan setelah udang dapat dibedakan secara visual dan udang matang gonad, sehingga membutuhkan waktu yang lama. Identifikasi dan verifikasi kelamin dapat dilakukan lebih dini dengan metode PCR dengan marka DNA terkait kelamin. Sistem kromosom pada udang galah berbeda dengan ikan, di mana individu betina bersifat heterogametik (WZ) dan jantan homogametik (ZZ). Namun dalam perkembangannya terdapat kendala dalam menentukan individu *neofemale* yang memiliki kromosom ZZ. Berdasarkan pendekatan sistem kromosom tersebut, maka dapat dijadikan acuan untuk membuat marka molekuler terkait kelamin udang galah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi marka molekuler terkait jenis kelamin pada udang galah. Penelitian ini diharapkan juga dapat digunakan dalam mengidentifikasi kelamin udang galah secara dini serta dapat diterapkan pada tahap seleksi individu hasil *sex reversal* sehingga dapat meminimalkan waktu seleksi. Hewan uji yang digunakan adalah populasi udang galah jantan dan betina yang berasal dari tangkapan alam Aceh dan Solo, serta udang galah jantan dan betina SIRATU hasil (seleksi individu di Instalasi Balai Besar Perikanan Air Tawar Pelabuhan Ratu). Sebanyak masing-masing 30 ekor udang galah baik jantan maupun betina dari 3 kelompok dikumpulkan untuk dilakukan koleksi genom DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kaki renang sebagai sampel. Pembuatan preparat kromosom berasal dari individu jantan dan betina udang galah asal Aceh.

Dalam proses amplifikasi PCR untuk genom DNA udang galah digunakan primer spesifik betina yaitu primer MrMK *Forward* 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3' (19 pb). Sedangkan *Reverse* yang digunakan adalah 5'-GCACTTAACCATGCGTCAG-3' (19 pb). Sebagai kontrol internal loading DNA digunakan primer β -aktin *Forward* 5'-GTGCGTGACATCAAGGAA-3' dan *Reverse* 5'-TAAGTGGTCTCGTGAATGC-3'. Berdasarkan hasil amplifikasi PCR dengan Primer MrMK belum dapat membedakan secara spesifik antara individu jantan dan betina oleh karena itu, produk PCR dari udang galah betina dan jantan dipurifikasi, dan kemudian disekuensing untuk mendapatkan bagian yang dapat dipilih sebagai target primer baru yang spesifik. Dari hasil penyejajaran sekuens udang galah jantan dan betina diperoleh daerah yang berbeda untuk dijadikan primer spesifik. Satu set kandidat primer spesifik MrMKn telah didesain sebagai berikut: *Forward*

5'-CAGTATTTTCGGAWTGGTATTGCTCGGG-3' *Reverse* 5'-CCGATAACTCTGCGAATGAGC-3'. Primer MrMKn bersifat spesifik pada betina dengan ukuran pita DNA sekitar 390 bp. Berdasarkan analisis PCR, kelompok udang galah betina dari Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo semuanya menghasilkan pita DNA. Pada kelompok udang galah jantan, diharapkan pita DNA tidak muncul pada semua individu, tetapi pita DNA ini muncul di kelompok udang galah jantan asal Aceh dan Sukabumi, masing-masing 5 dan 3 sampel atau 10 % dan 16 %. Ini berarti efektivitas MrMKn untuk membedakan jantan dan betina pada populasi udang asal Solo, SIRATU dan Aceh, masing-masing adalah 100 %, 90 % dan 84 %. Hal ini menunjukkan bahwa primer MrMKn belum dapat membedakan udang galah jantan dari semua populasi. Selain itu, dapat dikatakan bahwa ketiga udang galah uji adalah berbeda, khususnya sekuen gen terkait kelamin. Berdasarkan studi kariotipe yang dilakukan udang galah memiliki 2n :118 kromosom dengan rincian submetasentrik 4 pasang, subtelosentrik 13 pasang dan telosentrik 42 pasang, namun kromosom kelamin belum dapat diidentifikasi.

Kata kunci: kariotipe, marka kelamin, *neo-female*, udang galah.



SUMMARY

NOVI MEGAWATI. Identification of Sex Linked Molecular Markers in Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Supervised by ALIMUDDIN and RATU SITI ALIAH.

Male giant freshwater prawn grows faster than its female, therefore male monosexual culture as one solution to improve aquaculture production. The production of monosex male are higher by 63.13% than mixed populations because the energy is only focused on somatic growth. The all male populations of giant freshwater prawns can be produced by mating the neofemales (sex-reversed males) with normal males. The progeny test is usually used in the production process of monosex male, but sex only can be identification after the prawns mature and can be visually distinguished, so it takes a long time. Identification and verification of sex can be done earlier with the PCR method with sex linked DNA markers. The chromosome system in giant prawns is different from fish, where the female individual is heterogametic (WZ) and the male is homogametic (ZZ). However, in its development, there are obstacles in determining neofemale individuals who have the ZZ chromosome. Based on the chromosome system approach, it can be used as a reference for making molecular markers related to the sex of giant freshwater prawns.

This study was aimed to identify the molecular markers related to the giant freshwater prawn sex. And this research is expected to be used to identifying the sex of giant freshwater prawn early and can be applied at the stage of individual selection of sex reversal results so as to minimize the time of selection.

The animals experiment used were populations of male and female giant freshwater prawn from Aceh and Solo natural catches, as well as male and female SIRATU prawn (individual selection at Instalasi the Center of Freshwater Aquaculture Fisheries in Sukabumi). A total of 30 giant freshwater prawn, both male and female from 3 groups were collected for genome DNA collection. DNA extraction was carried out using a pleiopod as a sample. The chromosome preparations were made from individual male and female from Aceh. For the PCR amplification process from DNA genome prawn, a specific female primer was used is MrMK Forward 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3' (19 pb) and reverse used is 5'-GCACTTAACCATGCGTCAG-3' (19 pb). For internal control of DNA loading, primers β -actin Forward 5'-GTGCGTGACATCAAGGAA-3' and Reverse 5'-TAAGTGGTCTCGTGAATGC-3'.

Based on the results of PCR amplification with the MrMK primer, it was not able to specifically differentiate between male and female. Therefore, PCR products from female and male giant freshwater prawn were purified, and then sequenced to get the parts that could be selected as candidate specific primer. The result alignment of male and female, different region were obtained to be used as specific primers. A set of MrMKn-specific primers has been designed as follows: Forward 5'-CAGTATTTTCGGAWTGGTATTGCTCGGG-3' Reverse 5'-CCGATAACTCTGCGAATGAGC-3'. MrMKn primers were specific to females with a DNA band size of around 390 bp. Based on PCR analysis, female prawn groups from Aceh, Sukabumi (SIRATU) and Solo all produced DNA bands.

The male prawns group, it is expected that DNA bands will not appear in all individuals, but this DNA band appears in groups of male from Aceh and Sukabumi, respectively 5 and 3 samples or 10% and 16%. This means that the effectiveness of MrMKn in differentiating male and female populations from Solo, SIRATU and Aceh is 100%, 90% and 84%. The result shows that the MrMKn primer has not been able to distinguish male from all populations. In addition, it can be said that the three giant freshwater prawn were different, especially the gene sequences related to sex. Based on a karyotype study, giant prawns have $2n: 118$ chromosomes with details of 4 pairs of submetacentric, 13 pairs of subtelocentric and 42 pairs of telocentric, but the sex chromosomes have not been identified.

Key words: giant freshwater prawn, karyotype, neofemale, sex markers.



© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2020

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



IDENTIFIKASI MARKA MOLEKULER TERKAIT KELAMIN PADA UDANG GALAH (*Macrobrachium rosenbergii*)

NOVI MEGAWATI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains
pada
Program Studi Ilmu Akuakultur

**ILMU AKUAKULTUR
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2020**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis:

1. Dr. Mia Setiawati, M.Si

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





Judul Tesis : Identifikasi Marka Molekuler Terkait Kelamin pada Udang Galah
(*Macrobrachium rosenbergii*)

Nama : Novi Megawati
NIM : C151170021

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Dr. Alimuddin, S.Pi, M.Sc



Pembimbing 2:
Dr. Ir. Ratu Siti Aliah, M.Sc



Diketahui oleh

Ketua Program Studi
Prof. Dr. Ir. Widanarni, M.Si
195007061976031002



Dekan Sekolah Pascasarjana
Prof. Dr. Ir. Anas Miftah Fauzi, M.Eng
196004191985031002



Tanggal Ujian :
7 September 2020

Tanggal Lulus : 14 SEP 2020

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan November 2018 ini ialah identifikasi marka kelamin, dengan judul Identifikasi Marka Molekuler terkait Kelamin pada Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii*)

Penulis sangat menyadari bahwa dalam proses penyelesaian penelitian dan penulisan tesis ini dapat berjalan lancar dengan dukungan dari banyak pihak. Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Dr Alimuddin, MSc dan Ibu Dr Ir Ratu Siti Aliah, MSc selaku pembimbing. Di samping itu, penghargaan sampaikan kepada rekan-rekan staf Perikanan di Laptiab BPPT Serpong serta teman-teman dari AKU17. Selain itu terimakasih atas dukungan, doa dan segala kasih sayang dari kedua orang tua, suami dan anak.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Agustus 2020

Novi Megawati





DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
1. PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	2
Tujuan Penelitian	2
Manfaat Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	2
Udang Galah	2
Marka Kelamin	3
Kromosom	4
3. METODE	4
Waktu dan Tempat Penelitian	4
Hewan Uji	5
Ekstraksi Genom	5
Desain Primer dan Amplifikasi DNA	5
Purifikasi DNA	6
Ligasi dan Transformasi	6
Seleksi Koloni Positif dan Purifikasi Plasmid	7
Verifikasi Hasil Isolasi Plasmid dengan PCR	7
Verifikasi Plasmid dengan Menggunakan Enzim EcoRI	7
Sekuensing dan Desain Primer Spesifik	7
Uji Primer Spesifik Kandidat Marka	8
Kariotipe Kromosom	8
Analisis Data	8
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	9
Verifikasi Sensitivitas Primer Spesifik Betina MrMK	9
Kloning dan Transformasi	10
Primer Spesifik Kandidat Marka Molekuler	11
Kariotipe Kromosom	13
5. SIMPULAN DAN SARAN	14
DAFTAR PUSTAKA	15
RIWAYAT HIDUP	19

DAFTAR TABEL

1	Daftar Primer yang digunakan dalam penelitian	6
2	Hasil Aplikasi primer MrMK pada udang galah jantan dan betina asal Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo.	9
3	Hasil Aplikasi primer MrMKn pada udang galah jantan dan betina asal Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo.	12

DAFTAR GAMBAR

1	Perbedaan morfologi udang galah betina dan jantan	3
2	Hasil elektroforegram produk amplifikasi PCR dengan Primer MrMK berukuran 700 bp (atas) dan primer β -aktin berukuran 250 bp (bawah). Tanda panah di sebelah kanan menunjukkan target produksi PCR. M= Marka DNA, 1-9= nomor sampel genom udang galah	9
3	Hasil elektroforegram perbanyakkan sampel dengan primer MrMk berukuran 700 bp untuk purifikasi fragmen DNA. Tanda panah di sebelah kanan menunjukkan target produksi PCR. M= Marka DNA, 1-3 sampel genom udang galah	10
4	Hasil kloning dan transformasi (A) koloni putih biru hasil transformasi, (B) perbanyakkan koloni putih, (C) Kultur cair koloni putih	10
5	Hasil amplifikasi PCR koloni putih. Hasil digest koloni putih dengan enzim EcoRI. Tanda panah di sebelah kanan menunjukkan ukuran pita DNA target. M= Marka DNA, 1-9 = koloni bakteri	10
6	Penyejajaran sekuen DNA udang galah jantan dan betina hasil sekuensing dengan primer MrMK	11
7	Hasil elektroforegram produk amplifikasi PCR dengan primer MrMKn pada udang galah betina berukuran 390 bp (atas), dan β -aktin berukuran 250 bp (bawah). Tanda panah di sebelah kanan menunjukkan target produksi PCR. M= Marka DNA, 1-12= nomor sampel genom udang galah	11
8	Sebaran kromosom (2n:118) dan kariotipe udang galah jantan (A) dan betina (B).	13