

1 PENDAHULUAN

Latar Belakang

Udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) adalah spesies krustasea yang bernilai ekonomis di negara-negara Asia Tenggara, Asia Selatan, dan Australia Utara. Saat ini budidaya udang galah telah berkembang di negara-negara lain seperti di Amerika, Cina dan negara bagian Amerika (Zafar *et al.* 2015). Produksi global udang galah telah meningkat selama beberapa tahun terakhir, naik dari 197.546 menjadi 216.856 ton pada tahun 2014 (FAO 2018).

Pertumbuhan udang galah jantan lebih cepat dibandingkan betina. Dalam segi waktu udang galah jantan mencapai ukuran konsumsi lebih cepat dibandingkan udang betina. Hal tersebut menarik minat para pembudidaya untuk membudidayakan udang jantan monoseks sehingga dihasilkan panen udang yang relatif lebih tinggi serta waktu pemeliharaan yang lebih cepat. Menurut Nair *et al.* (1996) 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.

Untuk menunjang perkembangan budidaya monoseks jantan diperlukan dukungan suplai benih monoseks jantan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menghasilkan populasi monoseks jantan yaitu dengan mengawinkan *sex reversed* jantan (ZZ) dengan jantan normal (ZZ) (Sagi dan Cohen 1990; Aflalo *et al.* 2006). Dalam proses produksi betina ZZ, identifikasi kelamin dilakukan setelah udang dewasa dan dapat dibedakan secara visual, serta dikonfirmasi melalui uji progeni. Namun tahapan ini membutuhkan biaya pemeliharaan yang lebih mahal dan waktu yang lama. Identifikasi secara dini menggunakan metode PCR berpotensi mempercepat pembudidaya mengetahui udang galah *sex-reversed*.

Kromosom kelamin udang galah betina bersifat heterogametik telah dilaporkan oleh Justo *et al.* (1991), dengan kode kromosom WZ oleh Malecha *et al.* (1992). Selanjutnya, beberapa penelitian juga mengonfirmasi spesies lain dengan kromosom kelamin WZ/ZZ, yaitu udang karang dan udang penaeid (Benzie *et al.* 2001; Parnes *et al.* 2003; Coman *et al.* 2008). Menurut Staelens *et al.* (2008), sistem kromosom WZ/ZZ umum pada spesies macruran decapod krustasea (udang karang, lobster). Namun demikian, sampai saat ini belum ada yang melaporkan identifikasi pasangan kromosom kelamin udang galah dari hasil kariotipe.

Saat ini berbagai metode telah dikembangkan untuk membantu identifikasi kelamin secara molekuler. Akan tetapi hubungan jenis kelamin dengan penanda molekuler masih sedikit dilaporkan (Staelens *et al.* 2008).

Selain itu, analisis urutan lebih lanjut telah menunjukkan bahwa penanda ini didasarkan alel betina spesifik, menghasilkan hanya varian antara spesies jantan dan betina (Jiang dan Qiu 2013). Namun sampai saat ini belum ada yang memverifikasi sensitifitas marka yang dilaporkan oleh Jiang dan Qiu (2013) pada udang galah di Indonesia. Berdasarkan informasi tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk mengidentifikasi marka kelamin udang galah dengan menggunakan primer spesifik berdasarkan kelamin udang galah.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan 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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perumusan Masalah

Udang galah jantan lebih cepat tumbuh dibandingkan dengan betinanya, karenanya budidaya udang galah monoseks jantan menjadi salah satu solusi budidaya. Sistem kromosom pada udang galah berbeda dengan ikan dimana individu betina bersifat heterogametik (WZ). Berdasarkan hal tersebut, maka salah satu upaya menghasilkan populasi udang galah jantan adalah dengan pembentukan betina fungsional homogametik (*neo-female*). Sehingga apabila dikawinkan dengan jantan normal akan menghasilkan populasi jantan. Uji progeni biasa dilakukan dalam proses produksi jantan ZZ, 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 kelamin. Salah satu kandidat marka kelamin yang dapat digunakan yaitu marka gen spesifik betina AFLP (Jiang dan Qiu 2013). Sehingga udang bergenotipe ZW dan ZZ dapat dibedakan sejak dini dengan menggunakan marka ini.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi marka molekular terkait jenis kelamin pada udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) sehingga memungkinkan untuk mengidentifikasi jenis kelamin pada tahap perkembangan awal ketika perbedaan fenotipik belum jelas terlihat.

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan dalam mengidentifikasi kelamin udang galah secara dini serta dapat diterapkan pada tahap seleksi individu hasil *sex reversal* sehingga dapat meminimalkan waktu seleksi.

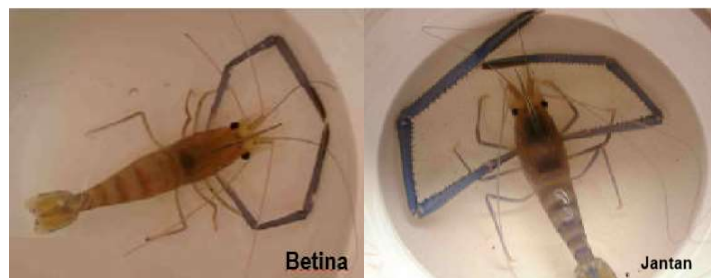
2 TINJAUAN PUSTAKA

Udang Galah

Klasifikasi udang galah *Macrobrachium rosenbergii* (de Man 1879) menurut Holthuis (1955) adalah sebagai berikut; filum *Arthropoda*, kelas *Crustacea*, ordo *Decapoda*, sub ordo *Caridea*, famili *Palaemonidae*, genus *Macrobrachium*, species *Macrobrachium rosenbergii*. Perbedaan morfologi udang galah dengan udang jenis lain adalah bentuk rostrum panjang dan melengkung. Rostrum bagian atas terdapat 11–13 gerigi bagian bawah terdapat 8–14 gerigi (Arisandi 2007). Bagian dada terdapat lima pasang kaki jalan (*periopoda*), bagian badan (*abdomen*) terdiri lima ruas masing–masing dilengkapi kaki renang (*pleiopoda*). Sedangkan perbedaan morfologi udang galah jantan dengan betina, terlihat dari bentuk badan, bentuk dan ukuran kaki jalan kedua (Gambar 1), serta letak alat kelamin (Wichins dan Lee 2002).

Siklus hidup udang galah secara alami memerlukan lingkungan tawar dan air payau, tumbuh dan dewasa di perairan tawar sungai atau rawa yang berhubungan

langsung dengan laut (Arisandi 2007). Udang galah muda (*juvenile*) beruaya ke air tawar, selanjutnya menjadi dewasa dan matang gonad memijah di sungai atau danau. Induk betina yang telah memijah dan mengerami telur, selanjutnya kembali beruaya ke muara sungai untuk melepas telurnya. Larva baru menetas segera mencari lingkungan hidup yang sesuai, yaitu air payau, untuk tumbuh menjadi pasca larva (*juvenile*) setelah melewati perkembangan larva hingga stadium akhir. Setiap tahap perkembangan terjadi pergantian kulit yang diikuti perubahan struktur morfologis.



Gambar 1 Perbedaan morfologi udang galah betina dan jantan.

Juvenile selanjutnya beruaya kembali ke air tawar (D'Abramo *et al.* 2001).

Menurut Aida *et al.* (1994) jenis kelamin jantan dan betina udang galah terpisah secara nyata pada individu yang berbeda (*diocious*). Alat kelamin jantan (*petasma*) berfungsi untuk menyalurkan sperma ke alat kelamin betina (*thelicum*) yang berfungsi untuk menampung sperma sebelum terjadi pembuahan. Telur yang keluar dari saluran telur (*oviduct*) selanjutnya dibuahi oleh sperma yang telah tersimpan. Pembuahan terjadi di luar tubuh (*external*). Telur yang telah dibuahi selanjutnya dierami induk betina sampai menetas (Wichins dan Lee 2002).

Secara biologis udang galah jantan cenderung lebih cepat tumbuh dibandingkan betina (Okumura 2004). Menurut Khasani dan Sopian (2013) udang galah jantan dapat mencapai panjang hingga 25 cm dan betina hanya mampu sampai 15 cm. Serta menurut Sagi *et al.* (1986) bahwa pembesaran udang galah menggunakan benih monoseks jantan akan memperoleh total produksi lebih tinggi dibandingkan benih campuran atau monoseks betina.

Marka Gen Kelamin

Penentuan jenis kelamin (seks determinasi) berada dibawah kendali genetik dapat diklasifikasikan dalam 2 kategori, yaitu jantan heterogamet dan betina heterogamet. Pada sistem jantan heterogamet, ditemukan pada manusia dan kebanyakan mamalia. Adanya kromosom Y yang menentukan sifat jantan. Jantan normal secara kromosomal adalah XY dan betina XX. Sistem penentuan seks ini umumnya dinyatakan sebagai metode XY. Sedangkan pada sistem metode betina heterogamet, banyak ditemukan pada golongan burung, ikan, krustasea, ayam, kupu-kupu, kepik air, ulat sutra.

Berdasarkan uji progeny pada spesies dekapoda, kecuali untuk sebagian besar kepiting (Cui *et al.* 2015, Trino *et al.* 1999) diasumsikan memiliki model WZ, dimana jantan ZZ dan betina WZ (Parnes *et al.* 2003, Lecher *et al.* 1995, Juchault dan Rigaud 1995). Penelitian tentang marker terkait gen spesifik kelamin beberapa diantaranya telah dilakukan seperti pada ikan *bighead carp* (*Hypophthalmichthys nobilis*) dan *silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Liu *et al.* 2018), *crucifix*

crab (Fang *et al.* 2019), *Palaemon elegans* (Torrecilla *et al.* 2017) serta *Macrobrachium rosenbergii* (Ventura *et al.* 2011, Jiang dan Qiu 2013, Ma *et al.* 2019).

Kromosom

Kromosom merupakan sekumpulan gen (DNA) dalam inti sel yang berperan dalam pewarisan sifat keturunan (Kirpichnikov 1981, Tave 1986, Hartono 2003), sedangkan gen merupakan unit genetik yang mengandung cetak biru atau kode biologi untuk menghasilkan fenotip (Tave 1986). Setiap spesies mempunyai kromosom yang unik dan berbeda, perbedaannya meliputi dari segi bentuk, ukuran, dan jumlahnya (Elridge 1985, Hartono 2003). Kromosom ini dibedakan menjadi dua yaitu autosom (kromosom tubuh) dan gonosom (kromosom kelamin). Autosom adalah kromosom yang secara morfologi tidak berbeda antara jantan dan betina, sedangkan gonosom adalah kromosom yang menentukan jenis kelamin individu. Karyotipe adalah gambaran lengkap dari kromosom pada metaphase dari suatu sel yang disusun secara teratur dan merupakan pasangan-pasangan dari sel diploid yang normal (Elridge 1985). Karyotipe dapat digunakan untuk mengidentifikasi genetik hasil hibrid dan membandingkan spesies yang berbeda, sitogenetik dan mutagenesis (Kligerman dan Bloom 1977), evolusi, pengelolaan stok ikan dan pencemaran lingkungan (Chourrout dan Happe 1986) penentuan jenis kelamin dan identifikasi ploidi suatu organisme (Carman 1990). Morfologi kromosom dapat diamati pada saat pembelahan sel pada tahap metaphase, karena pada tahap ini kromosom dalam keadaan padat maksimum dan dapat diwarnai (De Robertis dan De Robertis 1988, Widiyanti 2008). Oleh karena itu dalam pembuatan preparat kromosom diperlukan kolkisin untuk menghentikan pembelahan sel pada tahap metafase karena kolkisin dapat merusak benang-benang spindel dan efektif pada konsentrasi yang sangat rendah (Hartono 2003). Sedangkan pada pemberian kolkisin yang terlalu lama akan dapat menyebabkan kromosom berkontraksi (Denton dan Howell 1969). Lebih lanjut ditambahkan bahwa pada ikan teleostei jumlah metafase lebih banyak diperoleh dari ikan muda yang aktif. Akan tetapi menurut Robert (1967) apabila digunakan embrio yang terlalu muda (*blastomer*) dapat menimbulkan dua kelemahan yaitu pertama kromosom cenderung menjadi panjang dan sering kali membuat kesulitan dalam penentuan posisi sentromer dan penghitungannya, selain sulitnya membedakan sitoplasma dengan kromosom karena adanya persamaan warna yang ditimbulkannya. Dari hasil penelitian Justo *et al.* (1991) jumlah kromosom udang galah adalah 118 untuk diploid dan haploid 59.

3. METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan November 2018 hingga bulan November 2019 di Laboratorium Bioakuakultur, LAPTIAB (Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika) TAB, BPPT Serpong.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah populasi udang galah jantan dan betina yang berasal dari tangkapan alam Aceh (Sungai Peurlak) dan Solo (Sungai Bengawan Solo), serta udang galah jantan dan betina SIRATU. Udang galah SIRATU ini berasal dari 3 (tiga) varietas udang galah yakni dari sungai Bone, sungai Mahakam, dan sungai Citanduy dengan 9 (sembilan) kombinasi persilangan. Seleksi individu dilakukan di Pelabuhan Ratu, sehingga udang galah ini dilepas dengan nama Udang Galah SIRATU (Udang Galah Seleksi Individu di Pelabuhan Ratu) sesuai dengan Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia Nomor 25/Kepmen-KP/2015 tanggal 16 April 2015.

Populasi dari 3 varietas udang galah yang digunakan pada kegiatan produksi udang galah hibrida setibanya dari daerah asal langsung diaklimatisasi kurang lebih 60 menit. Apabila kondisi induk telah bergerak lincah menandakan proses aklimatisasi berhasil. Udang galah dimasukkan dalam keranjang pemeliharaan induk ukuran 30 cm x 20 cm x 10 cm dengan jumlah 1 ekor per keranjang. Hal ini dimaksudkan untuk meminimalisasi kanibalisme karena kondisi udang masih lemah. Keranjang ditempatkan di dalam bak fiber persegi panjang ukuran 240 cm x 150 cm x 50 cm atau volume 1.8 m³. Ketinggian air pada setiap bak pemeliharaan induk berkisar antara 30-40 cm dilengkapi dengan sistem aerasi, kran air masuk, dan pipa pembuangan. Antara induk betina dan induk jantan dipelihara secara terpisah pada bak yang berbeda. Penyiponan dilakukan setiap hari, untuk membersihkan kotoran yang mengendap di dasar bak. Pembersihan bak dengan menguras total air dalam bak, menyikat bak, serta membersihkan kotoran dan sisa pakan dalam bak dilakukan dua hari sekali sehingga kebersihan bak dan kualitas air tetap terjaga kondisinya.

Pakan yang diberikan berupa pakan pelet komersil berprotein tinggi, cumi, dan umbi-umbian. Frekuensi pemberian pakan 4 kali dalam satu hari. Pemberian pakan cumi dan pelet diberikan pada pagi dan siang hari sedangkan pada sore hari, induk udang galah diberikan pakan ubi jalar. Sebanyak masing-masing 30 ekor udang galah baik jantan maupun betina dari 3 kelompok dikumpulkan untuk dilakukan koleksi genom DNA. Udang galah yang digunakan adalah calon induk yang telah dapat dibedakan jenis kelaminnya. Pembuatan preparat kromosom berasal dari individu jantan dan betina udang galah asal Aceh.

Ekstraksi Genom

Metode ekstraksi genom DNA berdasarkan buku manual Sambrook (1989). Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kaki renang sebagai sampel. Metode fenol kloroform digunakan untuk melakukan ekstraksi DNA. Sampel hasil ekstraksi dapat disimpan dalam lemari pendingin suhu -20 °C sampai saat akan digunakan.

Desain Primer dan Amplifikasi DNA

Dalam proses amplifikasi PCR untuk genom DNA udang galah digunakan primer spesifik betina yang didesain berdasarkan (Jiang dan Qiu 2013). 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' (Zhu *et al.* 2004). Satu mikrogram DNA digunakan sebagai sampel untuk PCR, kemudian dicampur dengan 1 μ L primer *Forward* maupun *Reverse* (10 pmol/), 5 μ L MyTaq Redmix (Bioline, USA) kemudian ditambahkan *nuclease free water* sampai volume akhir menjadi 10 μ L. Proses PCR dijalankan pada suhu 95 °C selama 5 menit sebanyak 1 siklus; (95 °C selama 30 detik; 49,5 °C selama 35 detik; 72 °C selama 30 detik) sebanyak 35 siklus; 72 °C selama 2 menit sebanyak 1 siklus. Sebanyak 3 μ L DNA produk amplifikasi PCR digunakan untuk elektroforesis dengan menggunakan 1 % gel agarosa dan marka DNA. Visualisasi pita DNA dilakukan menggunakan GelDoc dengan bantuan cahaya ultraviolet.

Tabel 1 Daftar Primer yang digunakan dalam penelitian

Nama Primer	Sekuens (5'-3')	Aplikasi	Target ukuran
MrMK-F	GATGAGTCCTGAGTAACAA	Marka khusus betina	700 bp
MrMK-R	GCACTTAACCATGCGTCAG		
MrMKn-F	CAGTATTTTCGGAWTGGTATTGCTCGGG	Analisis marka berdasarkan sekuens pembeda	390 bp
MrMKn-R	CCGATAACTCTGCGAATGAGC		
MrB-aktin-F	GTGCGTGACATCAAGGAA	Amplifikasi gen beta aktin	250 bp
MrB-aktin-R	TAAGTGGTCTCGTGAATGC		

Purifikasi DNA

DNA diisolasi dari gel menggunakan kit Geneaid™ Gel/PCR DNA *Fragments Extraction Kit* (Geneaid, UK). Hasil PCR digabung menjadi satu dan dielektroforesis dengan gel agarosa 1,5 %. Kemudian gel dipotong pada bagian yang terdapat band DNA dengan panjang yang sesuai yaitu 700 bp lalu gel dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung mikro. Sebanyak 3 μ L hasil isolasi DNA dari gel dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% untuk mengetahui keberhasilan ekstraksi DNA dari gel.

Ligasi dan Transformasi

Tahap selanjutnya adalah ligasi fragmen DNA dengan vektor kloning pGEM-T Easy. Komposisi reaksi ligasi meliputi 5 μ L larutan DNA, 0,5 μ L pGEM-T Easy, 6,5 μ L 5x buffer ligasi, dan 1 μ L enzim T4 DNA ligase (TAKARA). Inkubasi dilakukan selama 2 jam pada suhu ruang, kemudian inkubasi dilanjutkan semalaman di lemari pendingin suhu 4 °C.

Hasil reaksi ligasi digunakan dalam proses transformasi. Transformasi adalah suatu proses memasukkan plasmid yang mengandung fragmen DNA insersi ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Sebanyak 6,5 μ L hasil reaksi ligasi dicampur ke dalam tabung mikro berisi sel kompeten. Transformasi dilakukan dengan cara kejutan panas suhu 42 °C selama 60 detik. Setelah diinkubasi *on-ice* selama 2-3 menit, ke dalam tabung mikro ditambahkan larutan SOC sebanyak 900 μ L. Selanjutnya tabung mikro berisi bakteri hasil transformasi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Kemudian bakteri disebar di atas cawan media SOB agar

yang mengandung IPTG, X-gal dan ampisilin. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama semalam.

Seleksi Koloni Positif dan Purifikasi Plasmid

Koloni putih yang tumbuh di atas media SOB agar diambil menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sebelumnya sudah berisi media SOB yang telah mengandung ampisilin 100 µL/mL. Inkubasi bakteri dilakukan dalam *incubator shaker* pada suhu 37 °C dan kecepatan 150 rpm selama sekitar 14 jam.

Master plate masing-masing koloni putih dibuat dengan menumbuhkan kembali koloni bakteri pada media agar SOB yang mengandung IPTG, X-gal dan ampisilin. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama semalam. Koloni yang tumbuh kemudian dilakukan isolasi plasmid dengan menggunakan teknik *alkaline lysis solution mini preparation* (Sambrook dan Russell 2001).

Verifikasi Hasil Isolasi Plasmid dengan PCR

Identifikasi hasil isolasi plasmid dilakukan dengan metode PCR untuk mengetahui keberadaan DNA insersi. Pemeriksaan DNA insersi dilakukan menggunakan primer MrMk. Proses PCR dijalankan pada suhu 94 °C selama 5 menit sebanyak 1 siklus; (94 °C selama 30 detik; 51,5 °C selama 30 detik; 72 °C selama 30 detik) sebanyak 35 siklus; 72 °C selama 2 menit sebanyak 1 siklus; dan 4 °C (tak hingga). Hasil PCR *insert* positif ditandai dengan munculnya pita DNA berukuran sekitar 700 bp.

Verifikasi Plasmid dengan Menggunakan Enzim Restriksi *EcoRI*

Verifikasi plasmid dilakukan dengan metode digesti menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Komposisi campuran digesti yaitu 3 µL DNA digunakan sebagai sampel untuk digesti, kemudian dicampur dengan 0,5 µL enzim *EcoRI* dan 10x buffer *EcoRI* sebanyak 1 µL serta tambahkan 5,5 µL *nuclease-free water* sampai volume akhir 10 µL. Campuran diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 37 °C dan dinaktivasi selama 20 menit pada suhu 65 °C. Hasil digesti divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %. Hasil positif digesti ditandai dengan munculnya dua pita DNA berukuran 3015 bp dan 700 bp.

Sekuensing dan Desain Primer Spesifik

Hasil purifikasi selanjutnya dikirim ke Firstbase Sequencing Singapura. Hasil sekuensing disejajarkan untuk mencari daerah yang berbeda untuk dijadikan primer spesifik. Sekuen dari udang galah jantan dan betina disejajarkan dengan menggunakan program BIOEDIT versi 7.2 selanjutnya dari hasil penyejajaran dipilih 1 pasang primer *forward* dan *reverse* sebagai primer spesifik untuk udang betina.

Uji Primer Spesifik Kandidat Marka

Primer spesifik digunakan untuk mendapatkan pasangan primer yang dapat membedakan antara udang galah jantan dan betina. Optimasi PCR dilakukan dengan mengubah suhu *annealing*, sehingga didapatkan program yang menghasilkan produk PCR spesifik untuk udang galah betina.

Kariotipe Kromosom

Metode preparat kromosom mengacu kepada Kucinski *et al.* (2015). Udang galah direndam dalam larutan kolkisin 0,007 % w/v selama kurang lebih 6-9 jam. Selama perendaman ini udang uji dibiarkan hidup. Spesies uji diambil jaringannya. Jaringan tadi kemudian dipotong-potong kecil dan selanjutnya direndam dalam larutan hipotonik (KCl 0,075 M) selama 60 menit pada suhu ruang. Selama perendaman, larutan hipotonik diganti setiap 30 menit dengan volume kurang lebih 20 kali volume jaringan. Larutan hipotonik 0,075 M dibuat dengan melarutkan 5,6 gram KCl dalam 1 liter akuades. Setelah perlakuan hipotonik, kemudian dilanjutkan dengan merendam jaringan tersebut ke dalam larutan fiksatif (larutan Carnoy) selama 60 menit (2x30 menit). Setelah difiksasi proses dilanjutkan dengan pembuatan preparat langsung atau bila diperlukan jaringan yang telah difiksasi tadi dapat disimpan dalam refrigerator selama 2-3 minggu.

Jaringan diletakkan di atas objek gelas cekung serta ditambahkan 3-4 tetes asam asetat glacial 50 %, selanjutnya digerak-gerakan secara perlahan-lahan menggunakan tusuk gigi atau ujung pisau bedah agar sel lepas dari jaringan pengikatnya. Suspensi yang terbentuk disedot dengan menggunakan pipet tetes secara hati-hati sehingga tidak terbentuk gelembung udara. Suspensi yang telah disedot kemudian ditetaskan di atas objek gelas yang ditempatkan di atas *hot plate* dengan kisaran suhu 45-50 °C, dan selanjutnya diisap kembali setelah terbentuk lingkaran berdiameter 1- 1,5 cm. Pada setiap objek gelas dibuat 3 hingga 4 buah lingkaran. Untuk objek gelas ini juga direndam alkohol 70 %. Setelah lingkaran terbentuk selanjutnya objek gelas dikering-udarkan pada suhu ruang sebelum dilakukan pewarnaan preparat.

Pewarnaan dilakukan merendam preparat dalam larutan Giemsa 20 % selama kurang lebih 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya preparat dibilas menggunakan akuades, kemudian objek gelas tersebut dikeringkan pada suhu ruang. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 100, 400 dan 1000 kali untuk dihitung jumlah kromosom serta diamati bentuk dan ukurannya. Sebaran kromosom yang baik dan jumlahnya yang lengkap kemudian didokumentasikan.

Analisis Data

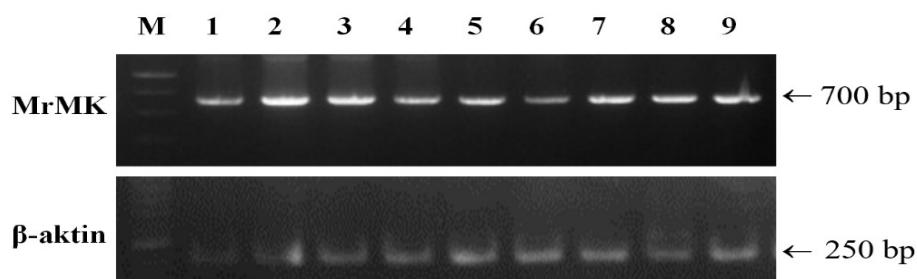
Analisis data hasil isolasi dan karakterisasi marka kelamin udang galah dilakukan secara deskriptif. Data hasil sekuensing, sekuen yang diperoleh selanjutnya akan dibandingkan tingkat kemiripannya dengan genom marka kelamin udang galah yang telah tersedia di Bank Gen menggunakan perangkat lunak aplikasi *basic local alignment search tool* (BLAST) (Altschul *et al.* 1990), yang tersedia secara online di situs NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Sedangkan peruntutan dan pensejajaran hasil sekuen serta pembuatan desain primer

dengan menggunakan program *BioEdit* (Hall 1999), MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Selanjutnya pada setiap sampel dianalisis secara kualitatif berdasarkan hasil PCR.

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Verifikasi Sensitivitas Primer Spesifik betina MrMK

Hasil PCR dengan primer MrMK *Forward* dan *Reverse* menunjukkan produk yang jelas terlihat dengan ukuran pita DNA sekitar 700 bp, dan β -aktin sekitar 250 bp (Gambar 2).



Gambar 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.

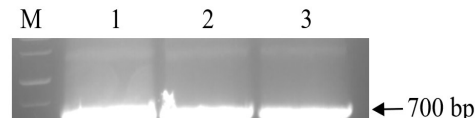
Berdasarkan hasil amplifikasi PCR, persentase udang galah dari tiga sumber berbeda yang menunjukkan adanya produk pita DNA direkapitulasi di Tabel 2. Selanjutnya, primer MrMK tersebut belum dapat membedakan secara spesifik antara individu jantan dan betina (Tabel 2). Oleh karena itu, produk PCR dari udang galah betina dan jantan dipurifikasi, dan kemudian disekuensing untuk mendapatkan bagian yang dapat dipilih sebagai target primer baru yang spesifik.

Tabel 2 Hasil Aplikasi primer MrMK pada udang galah jantan dan betina asal Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo.

Sampel	Jenis Kelamin	Produk PCR positif (ekor)	Persentase (%)
Aceh	Betina	30	100
SIRATU	Betina	30	100
Solo	Betina	30	100
Aceh	Jantan	9	30
SIRATU	Jantan	9	30
Solo	Jantan	5	16

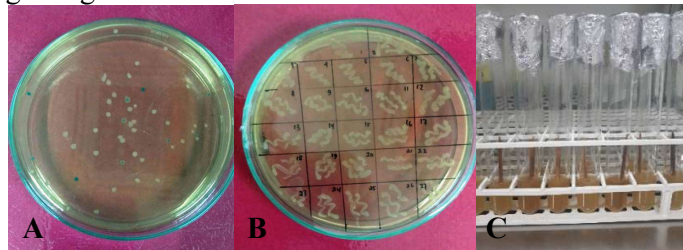
Kloning dan Transformasi

Hasil amplifikasi PCR menggunakan total genom udang galah sebagai templatnya telah berhasil menghasilkan satu pita DNA tebal dengan ukuran 700 bp. Namun pita DNA tersebut terdeteksi pada kelompok udang jantan dan betina. Oleh karena itu diperlukan sekuensing sebagai bahan analisis selanjutnya untuk dijadikan marka molekuler terkait kelamin pada udang galah. Pita DNA dengan ukuran 700 bp telah berhasil dipurifikasi. Untuk selanjutnya diligasikan ke vektor kloning pGEM T-Easy.



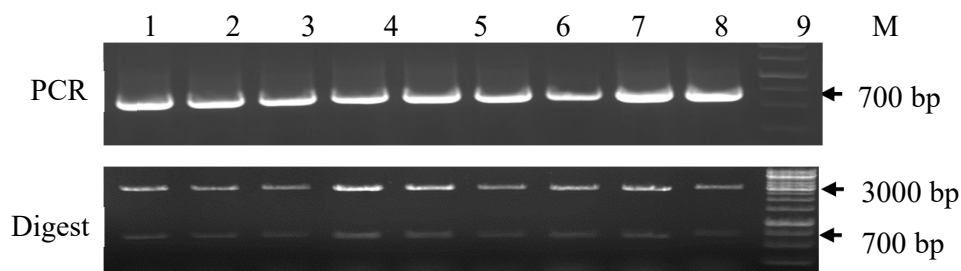
Gambar 3 Hasil elektroforegram perbanyak sampel dengan primer MrMk berukuran 700 bp untuk purifikasi fragmen DNA. Tanda panah di sebelah kanan menunjukkan target produksi PCR. M= Marka DNA, 1-3 sampel genom udang galah.

Hasil Kloning dan transformasi ditunjukkan dengan tumbuhnya koloni putih biru. Seleksi koloni putih dilakukan dengan isolasi plasmid untuk selanjutnya diverifikasi dengan digest dan PCR.



Gambar 4 Hasil kloning dan transformasi (A) koloni putih biru hasil transformasi, (B) perbanyak koloni putih, (C) Kultur cair koloni putih.

Konfirmasi koloni positif dilakukan dengan metode digesti dengan hasil PCR dan enzim restriksi ditunjukan gambar 5. Hasil verifikasi koloni positif selanjutnya digunakan sebagai *template* sekuensing.



Gambar 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.

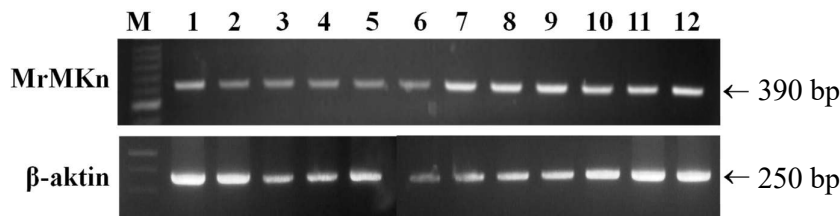
Primer Spesifik Kandidat Marka Molekular

Hasil sekuensing produk PCR ditampilkan pada Gambar 6. Dari hasil penyejajaran sekuens udang galah jantan dan betina diperoleh daerah yang berbeda untuk dijadikan primer spesifik. Satu set kandidat primer spesifik (MrMKn) sebagai marka molekular pembeda kelamin udang galah jantan dan betina didesain (Gambar 6). Daerah tersebut dipilih dengan pertimbangan bahwa ujung 3 berperan penting saat *annealing* dan ekstensi primer pada awal PCR (Onodera, 2007).

Jantan	TTTCGGAWTGGTATTGCTCGGGA	917
Betina	TTTCGGATTGGTATTGCTC-GGA	743
Jantan	TGATGGTCATCGAACGGGCGCCTGTCAGCCATGCGATCAACGAGTCACTACAATGGGCGG	977
Betina	TGATGGTCATCGAACGGGCGCCTGTCAGCCATGCGATCAACGARTCACTACAATGGGCGG	803
Jantan	CAGGTGCCATTACTACGCTGATAGTCTCTCGGTCAATGAGCTTGGAGTCATGGCCATGT	1037
Betina	CAGGTGCCATTACTACGCTGATAGTCTCTCGGTCAATGAGCTTGGAGTCATGGCCATGT	863
Jantan	TTCTCGGCGCCGATTGCTGCGGGCCTCGTGTCCATGCTGCACGGATTCCACTATGCGGCCC	1097
Betina	TTCTCGGCGCCGATTGCTGCGGGCCTCGTGTCCATGCTGCACGGTTCCACTATGCGGSCC	923
Jantan	ATCGGGTCTCCCTGCGGCCTAGTCTCCATTGGGGTAAGCAGATCGCGCAGAGTGGCATGC	1157
Betina	ATCGGGTCTCCCTGCGGCCTASTCTCCATTGGGGTAAGCARATCGCGCAGAGTGGCATGC	983
Jantan	CGGCGATCCCGCTTCAGCCTGATGATGTGTTGGCCACAGCATGGACCGCTTTTCTCATTC	1217
Betina	CGKCGATCCCGCTTCAGCCTGATGATGTGTTGGCCACAGCATGGACCGCTTTTCTCATTC	1043
Jantan	AGCGCTGGCTGGACCTCTCCACACTGGGCATTATGCTCATTTCGAGAGTTATCGGGAA	1277
Betina	AKCGCTGGCTGGACCTCTCCACACTGGGCATTATGCTCATTTCGAGAGTTATCGAGAA	1103

Gambar 6 Penyejajaran sekuen DNA udang galah jantan dan betina hasil sekuensing dengan primer MrMK.

Selanjutnya, basa nukleotida G dan C memiliki 3 ikatan hidrogen, sehingga lebih stabil dibandingkan basa A dan T yang hanya memiliki 2 ikatan hidrogen Griffiths *et al.* (2005). Optimasi suhu *annealing* diperlukan agar primer menempel dengan baik, produk PCR banyak, dan pita DNA menjadi lebih jelas terlihat. Hasil optimasi menunjukkan bahwa suhu *annealing* terbaik adalah 43 °C. Contoh hasil PCR dengan suhu *annealing* tersebut disajikan pada Gambar 7. Suhu *annealing* yang diperoleh sesuai dengan kisaran suhu *annealing* yang direkomendasikan, yaitu 40-60 °C (Walker dan Rapley, 2002). Primer MrMKn diujikan pada udang galah jantan dan betina asal Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo. Seperti ditunjukkan pada Gambar 7, primer MrMKn bersifat spesifik pada betina dengan ukuran pita DNA sekitar 390 bp.



Gambar 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.

Berdasarkan analisis PCR, kelompok udang galah betina dari Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo semuanya menghasilkan pita DNA (Tabel 3). 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 %.

Tabel 3. Hasil Aplikasi primer MrMKn pada udang galah jantan dan betina asal Aceh, Sukabumi (SIRATU) dan Solo

Sampel	Jenis Kelamin	Produk PCR Positif (ekor)	Persentase (%)
Aceh	Betina	30	100
SIRATU	Betina	30	100
Solo	Betina	30	100
Aceh	Jantan	5	16
SIRATU	Jantan	3	10
Solo	Jantan	0	0

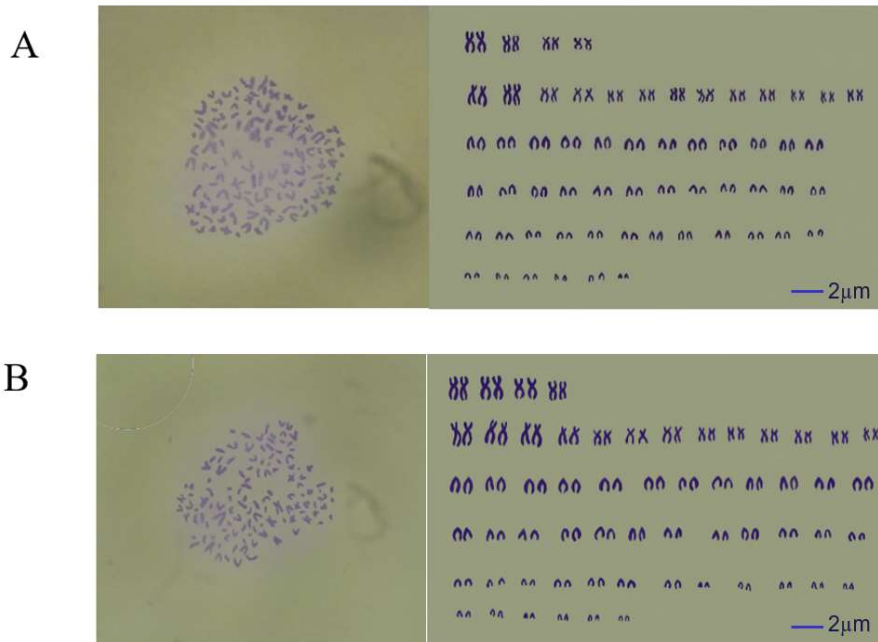
Hal ini menunjukkan bahwa primer MrMKn belum dapat membedakan udang galah jantan dari semua populasi. Selain itu, dapat dikatakan bahwa ketiga udang galah uji adalah berbeda, khususnya sekuen gen terkait kelamin. Berdasarkan hasil tersebut, perlu dilakukan penelitian lanjutan, dengan mengisolasi *full* sekuen sehingga didapatkan kandidat daerah lain dari sekuen yang dapat membedakan udang galah Indonesia.

Beberapa penelitian menunjukkan adanya potensi beberapa gen terkait kelamin dapat dijadikan marka pembeda. Yu *et al.* (2014) menerangkan bahwa hasil analisis qPCR gen *Dmrt* pada udang galah menunjukkan pola ekspresi yang berbeda pada perkembangan dimorfik seksual dan embrio yaitu gen *MroDmrt11E* dan *MroDmrt99b*. Selain itu kadar N-acetyltransferase dan melatonin pada bagian lobus optik udang galah dilaporkan pada udang galah jantan tidak berbeda signifikan, akan tetapi pada udang galah betina berbeda signifikan pada udang galah betina (Withyachumnarnkul *et al.* 1999).

Populasi monoseks jantan dapat dihasilkan dengan mengawinkan *sex reversed* betina (ZZ) dengan jantan normal (ZZ) (Sagi dan Cohen 1990; Aflalo *et al.* 2006). Dalam proses produksi betina ZZ, identifikasi kelamin dilakukan setelah udang dewasa dan dapat dibedakan secara visual, serta dikonfirmasi melalui uji progeni. Namun tahapan ini membutuhkan biaya pemeliharaan yang lebih mahal dan waktu yang lama. Identifikasi secara dini menggunakan metode PCR berpotensi mempercepat identifikasi udang galah betina ZZ (*neofemale*). Primer MrMKn berpotensi digunakan dalam proses seleksi udang galah betina ZZ asal Solo tanpa harus melalui uji progeni, sehingga penentuan kandidat betina ZZ lebih cepat. Akan tetapi primer masih perlu didesain ulang untuk membedakan *neofemale* asal Sukabumi dan Aceh.

Kariotipe Kromosom

Berdasarkan jumlah kromosom dengan modus yang tertinggi, diketahui bahwa udang galah memiliki 118 kromosom dengan kariotipe ditunjukkan pada Gambar 8. Udang galah yang dipakai adalah udang SIRATU, hasil pengamatan kariotipe ($2n:118$) didapatkan bahwa untuk udang jantan dan betina memiliki submetasentrik 4 pasang, subtelosentrik 13 pasang dan telosentrik 42 pasang. Namun demikian, dengan kariotipe biasa kromosom kelamin udang galah belum dapat diidentifikasi.



Gambar 8 Sebaran kromosom ($2n:118$) dan kariotipe udang galah jantan (A) dan betina (B).

Penelitian mengenai jumlah kromosom dari family *Palaemonidae* telah dilakukan pada *M. rosenbergii* oleh Gopal *et al.* (1991) dengan kariotipe metasentrik 19 pasang, submetasentrik 7 pasang dan telosentrik 33 pasang ($2n:118$), Justo *et al.* (1991) 45 pasang metasentrik dan submetasentrik, 14 pasang telosentrik dan subtelosentrik ($2n:118$), dan Damrongphol *et al.* (1991) dengan 50 pasang metasentrik dan submetasentrik, 9 pasang telosentrik dan subtelosentrik ($2n:118$).

Dari beberapa penelitian tersebut, kariotipe udang galah memiliki komposisi kromosom yang beragam dari ukuran dan bentuknya. Menurut Cucchi dan Baruffaldi (1990) studi kariologi pada ikan teleost memiliki kesulitan teknis yang disebabkan oleh kecilnya ukuran kromosom serta jumlahnya yang banyak. Hal tersebut juga terjadi pada saat preparasi kromosom udang galah, dimana sel kromosom cenderung mudah rusak dan tidak lengkap. Selain itu adanya variasi morfologi diantara kromosom homolog di nukleus menjadi hambatan utama (Al-Sabti 1991; Levan *et al.* 1964) serta adanya polimorfisme sering terjadi pada spesies ikan yang sama (Al-Sabti 1991).

Pada penelitian ini belum dapat dibedakan kromosom kelamin udang galah. Metode yang mungkin dapat digunakan adalah *fluorescence in situ hybridization* seperti dilaporkan oleh Whyte *et al.* (2007) pada tikus *Mus musculus* dengan menggunakan probe berdasarkan gen Sry. Penelitian lain memanfaatkan gen CHD1 pada ikan *Chionodraco hamatus* (Cocca *et al.* 2015), sedangkan udang *Palaemon serratus* menggunakan gen Dm (Tizon *et al.* 2013).

Penelitian tentang marka kelamin udang galah diharapkan dapat membantu proses produksi benih jantan ZZ hasil mengawinkan betina ZZ dan jantan ZZ. Tanpa perlu melakukan uji progeni yang membutuhkan waktu dan biaya yang lebih besar. Sehingga dapat menunjang perkembangan budidaya monoseks udang galah jantan dengan menyediakan benih udang galah jantan berkualitas dalam waktu yang lebih singkat. Hasil kariotipe udang galah pada penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai langkah awal dalam perbaikan stok dengan rekayasa poliploidi, deteksi hibridisasi dan rekayasa genetika.

SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini membuktikan bahwa primer MrMKn dapat membedakan antara jantan ZZ dan betina WZ udang galah asal Solo, tetapi belum spesifik untuk udang asal Aceh dan SIRATU asal Sukabumi. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mendapatkan primer spesifik yang dapat membedakan populasi udang galah di Indonesia.

Kariotipe udang galah jantan dan betina telah berhasil dibuat, tetapi belum dapat menentukan kromosom kelaminnya. Metode *fluorescence in situ hybridization* dapat diuji pada penelitian selanjutnya untuk menentukan kromosom kelamin.

DAFTAR PUSTAKA

- Aflalo ED, Hoang TTT, Nguyen VH, Lam Q, Nguyen DM, Trinh QS, Raviv S, Sagi A. 2006. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 256: 468–478.
- Aida K, Okumura T, dan Wilder MN. 1994. Reproductive Mechanisms in Crustacea. Kanagawa International Fisheries Training Center. JICA. Japan. 45 pp.
- Al-Sabti K. 1991. Handbook of genotoxic effect and fish chromosome. Ljubljana p.97.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Arisandi A. 2007. Efektivitas ekstrak steroid teripang untuk memanipulasi kelamin udang galah. [Tesis]. Sekolah pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Benzie JAH, Kenway M, Ballment E. 2001. Growth of *Penaeus monodon* *Penaeus esculentus* tiger prawn hybrids relative to the parental species. *Aquaculture* 193, 227–37.
- Carman O. 1990. Ploidy manipulation in some warm-water fish. Master thesis. Tokyo University of Fisheries. 69p.
- Chourrout D dan Happe A. 1986. Improved method of direct chromosome preparation in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 52;255-261.
- Cocca E, Petraccioli A, Morescalchi M.A, Odierna G, Capriglione T. 2015. Laser microdissection-based analysis of the Y sex chromosome of the Antarctic fish *Chionodraco hamatus*. *Comparative Cytogenetic*. 9(1) 1-15.
- Coman FE, Sellars MJ, Norris BJ, Coman GJ, Preston NP. 2008. The effects of triploidy on *Penaeus Marsupenaeus japonicus* (Bate) survival, growth and gender when compared to diploid siblings. *Aquaculture* 276, 50–9.
- Cucchi C dan Baruffaldi A. 1990. A new method for karyological studies in teleost fishes. *Fish Biology* 37 71-75.
- Cui Z, Hui M, Liu Y. (2015). High-density linkage mapping aided by transcriptomics documents ZW sex determination system in the chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Heredity* 115 (3), 206–215.
- D'Abramo LR, Brunson W, and Daniels WH. 2001. Freshwater Prawns Biology and Life History. Extension Service of Mississippi State University. <http://www.msucare.com/pubs/is1525.html> [9 November 2018]
- Damrongphol Praneet, Nittaya eangchuan, Supaporn Ajru, Boonserm Poolsanguan dan Boonsirm Withyachumnarnkul. 1991. Karyotype of the giant freshwater prawn *Macrobrachium* prawn. *Science Socio Thailand* 17 57-69.
- De Robertis EDP and EMF De Robertis. 1988. Cell and molecular biology. Inform Limited All Right reserved. Hongkong. 743p.
- Denton TE dan WM Howell. 1969. A technique for obtaining chromosome from the scale epithelium of teleost fishes. Departement of Biology Semford University, Birmingham, Alabama. P.392-393.
- Eldridge FE. 1985. Cytogenec of livestock. Te Avi Publishing Company, Inc America. 298p.

- Fang S, Zhang Y, Shi X, Zheng H, Li S, Zhang Y, Fazhan H, Waiho k, Tan H, Ikhwanuddin M, Ma H. 2019. Identification of male-specific SNP markers and development of PCR-based genetic sex identification technique in crucifix crab (*Charybdis feriatus*) with implication of an XX/XY sex determination system. *Genomics*. doi:10.1016/j.ygeno.2019.03.003.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. Global Production Statistics 1950-2011. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/query/en>.
- Gopal K, Seema F dan Atul KJ. 1991. Karyotypic studies of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the Indian fisheries association* 21 47-48
- Griffith AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT dan Miller JH. 2005. An introduction to genetic analysis. W.H Freeman and Company America.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 41:95-98.
- Hartono DP. 2003. Karakteristik kromosom ikan kerapu. [Tesis]. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Holthuis LB. 1955. The recent genera of the caridean and stenopodidean shrimps (Class Crustacea, order Decapoda, supersection Natantia) with keys for their determination.— *Zoologische Verhandelingen* 26: 1-157
- Jiang Xue-Hui dan Qiu Gao-Feng. 2013. Female only sex linked amplified fragment length polymorphism markers support ZW/ZZ sex determination in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Animal genetic*. doi:10.1111/age.12067.
- Justo CC, Murofushi M, Aida K, Hanyu I. 1991. Karyological studies on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 97: 327–334.
- Khasani I dan Sopian A. 2013. Pertumbuhan dan sintasan benih udang galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) pada pendederan berbasis sistem heterotrof dengan padat tebar berbeda. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8 (3): 373-382.
- Kirpichnikov NS. 1981. Genetic base of fish selection. Springer Verlaag Berlin, Heidelberg. New York. 401p.
- Kligerman AD dan SE Bloom. 1977. Rapid chromosome preparation from solid tissue of fishes. *Fish Research Board*. 34;266-269.
- Kucinski M, Demska-Zakes K, Zarski D, Liszewski T, Fopp-Bayat D, Jankun M and Furgala-Seleznio G. 2015. The morphological, histological and cytogenetic characteristics of goldfish *Carassius auratus* (L.) × common carp *Cyprinus carpio* (L.) hybrids. *Caryologia*. 68(2):77-83.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome. *Heredities* 52 201-220.
- Liu H, Pang M, Yu X, Zhou Y, Tong j, Fu B. 2018. Sex-specific markers developed by next generation sequencing confirmed an XX/XY sex determination system in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) dan silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *DNA Research*. 25(3)257-264.
- Ma Ke-Yi, Yu Shu-Hui, Du Yu-Xin, Feng Shi-Qing, Qiu Liang-Jie, Ke Dai-Yi, Luo Mei-Zhong, Qiu Gao-feng. 2019. Construction of a genomic bacterial

- artificial chromosome (BAC) library for the prawn *Macrobrachium rosenbergii* and initial analysis of ZW chromosome-derived BAC inserts. *Marine Biotechnology*. Springer Nature. doi:10.1007/s10126-018-09873-8.
- Malecha SR, Nevin PA, Ha P, Barck LE, Lamadrid-Rose Y, Masuno S. dan Hedgecock D. 1992. Sex-ratios and sex-determination in progeny from crosses of surgically sex-reversed freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 105, 201–18.
- Nair C, Salin K, Raju M, Sebastian M. 2006. Economic analysis of monosex culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man): a case study. *Aquaculture Research* 37:949–54.
- Okumura T. 2004. Review. Perspectives on Hormonal Manipulation of shrimp Reproduction. *JARQ*, 38 (1): 49-54.
- Onodera K. 2007. Selection for 3-end triplets for polymerase chain reaction primer. In Yuryev A. (ed). 2007. Methods in molecular biology: PCR primer design. Humana Press, Totowa, NJ 402:415p.
- Robert FL. 1967. Chromosome cytology of the *Osteichthyes*. *Program Fish-Culture* 29:75-83.
- Sagi A dan Cohen D. 1990. Growth, maturation and progeny of sex-reversed *Macrobrachium rosenbergii* males. *World Aquaculture* 21: 87–90
- Sagi A. Savir Z. Ra'nan, dan C. Yaha-nonwox. 1986. Production *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in monosex population: Yield characteristics under intensive monoculture condition in cages. Elsevier science publishers BV Amsterdam, p 265-274.
- Sambrook J. 1989. Molecular Cloning : a Laboratory Manual., New York: ColdSpring Harbor Laboratory.
- Sambrook JF dan Russel DW. (Ed). 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Staelens J, Rombaut D, Vercauteren I, Argue B, Benzie J, Vuylsteke M. 2008. High-density linkage maps and sexlinked markers for the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics* 179: 917–925.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tave D. 1986. Genetics for fish hatchery managers. Avi. Publication Wesport, Connecticut. 299p.
- Tizon AMG, Veronica R, Elisabeth M, Zeltia T dan Andres M. 2013. Karyological analysis of the shrimp *Palaemon serratus* (Decapoda: Palaemonidae). *crustacean biology* 33(6) 843-848.
- Torrecilla Z, Martinez-lage, Perina A, Ortegón EG, Tizon AMG. 2017. Comparative cytogenetic analysis of marine *Palaemon* species reveal a X₁X₁X₂X₂/X₁X₂Y sex chromosome system in *Palaemon elegans*. *Frontiers in Zoology*. 14:47.
- Trino AT, Millamena OM dan Keenan C. 1999. Commercial evaluation of monosex pond culture of the mud crab *Scylla* species at three stocking densities in the Philippines. *Aquaculture* 174 (1–2), 109–118.
- Ventura T, Aflalo ED, Weil S, Kashkush K, Sagi A. 2011. Isolation and characterization of female-specific DNA marker in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Heredity*.107;456-461.

- Walker JM dan Rapley R. 2002. Molecular biology and biotechnology fourth edition. The Royal society of Chemistry. 555p.
- Whyte JJ, Roberts RM, Rosenfeld CS. 2007. Fluorescent in situ hybridization for sex chromosome determination before and after fertilization in mice. *Theriogenology* 67 :1022-1031.
- Wichins JF dan Lee DOC. 2002. Crustacean Farming (Raching and Culture). Iowa State University Press. Blackwell Science Company. USA. 446 pp.
- Widiyanti PM. 2008. Tetraploidisasi pada ikan lele afrika *Clarias gariepinus* Burcell (1822). [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor.
- Withyachumnarnkul B, Ajpru S, Rachawong S, Pongsa-Asawapaiboon A, Sumridthong A. 1999. Sexual dimorphism in N-acethyltransferase and melatonin levels in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Pinela Research* 26:174-177.
- Yu Y-Q, Ma W-M, Zeng Q-G, Qian Y-Q, Yang J-S, Yang W-J. 2014. Molecular cloning and sexually dimorphic exspression of two Dmrt genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Agricultures Sciences* 3(2):181-191.
- Zafar M, Soomro MH, Daudpota AM, Memon AJ, Ishaqi AM. 2015. Effect of different salinities on survival of freswater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) larvae at seed production unit Hawksbay Karachi-Pakistan. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinar*
- Zhu X-J, Dai Z-M, Jun Liu, Yang W-J. 2004. Actin gene in prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Characteristics and differential tissue expression during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B 140(2005):599-605.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bogor pada tanggal 24 November 1985 sebagai anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan bapak Surahmat dan ibu Nani Riani. Pendidikan sekolah menengah atas ditempuh di SMAN 9 Bogor, dan lulus pada tahun 2003, penulis melanjutkan pendidikan sarjana pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, dan berhasil lulus pada tahun 2008. Kesempatan untuk melanjutkan pendidikan program magister (S2) di Institut Pertanian Bogor (IPB) di Bogor diperoleh pada tahun 2017 pada Mayor Ilmu Akuakultur, dengan beasiswa dari Pusat Pembinaan, Pendidikan dan Pelatihan, Badan Pengkajian dan Penerapan teknologi (BPPT).

Penulis mulai bekerja sebagai perekayasa di BPPT, Serpong sejak tahun 2008 sampai dengan sekarang. Artikel ilmiah berjudul “Identification of Sex Linked molecular markers in Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*” sedang dalam proses dipublikasikan di Jurnal Ilmiah Nasional terakreditasi Indonesian Aquaculture

@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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.