



CONSTRUCT AND PRODUCTION GONAD-INHIBITING HORMONE dsRNA of BLACK TIGER PRAWN (*Penaeus monodon*) by *in vitro* and *in vivo* Technique in L4440 Expression Vector

Student : Anggi Shestita Wulandari
Thesis (2010), Master's program in Biotechnology, School of Life Sciences and Technology ITB,
email: anggi.shestita@yahoo.com

Advisors : Dr.Adi Pancoro¹ and Dr.Sony Suhandono²
1) School of Life Sciences and Technology-ITB, email: adi@sith.itb.ac.id
2) School of Life Sciences and Technology-ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Degree : Magister Sains (M.Si), Conferred July 2010

Abstract

Black tiger prawn (*Penaeus monodon*) is one of the valuable aquaculture commodities from Indonesia with great demand in the world that increases every year. Thereby increasing *Penaeus monodon* egg production in hatchery become more important nowadays. A conventional technique that had been used for years is eyestalk ablation by which gonad maturation process is stimulated. This technique, however, causes the broodstock can not be used for more than two cycles beside the decrease of egg quality. One approach to overcome this problem is RNA interference (RNAi), a technology that can inhibit Gonad Inhibiting Hormone (GIH) expression to stimulate gonad maturation. RNAi technology was done by producing GIH double-stranded RNA (dsRNA) by *in vitro* and *in vivo* techniques. Production of dsRNA started with total RNA isolation from eyestalk and reverse-transcribed by iScriptTM cDNA Synthesis Kit. GIH fragment was generated by designing 3 pairs of primer in small-interfering RNA (siRNA) potential region. Those three pairs of primer was used to amplify GIH fragment by touchdown PCR. Production of *in vitro* dsRNA was conducted by using MEGAscript[®] RNAi kit. A 271-bp GIH dsRNA was injected to two 12-14 months old female prawns. However, the injection did not accelerate spawning, probably related to the low dosage. Therefore, we need to produce large scale GIH dsRNA by *in vivo* method. GIH fragment that generated by touchdown PCR was ligated to pGEM[®] T-Easy cloning vector. The fragment was restricted with *Not*I restriction enzyme and then ligated to L4440 expression vector. HT115 strain *E.coli* then transformed with the expression vector. Expression of GIH dsRNA in bacteria was induced by IPTG and then isolated by modified TRIzol method. A ±750-bp band proved that GIH dsRNA has been isolated from transformant bacteria. Sequencing and reverse-transcription PCR also confirmed that GIH dsRNA has been successfully constructed in L4440 expression vector.

Keywords : *Penaeus monodon*, RNAi, double-stranded RNA, GIH

KONSTRUKSI dan PRODUKSI dsRNA *GONAD-INHIBITING HORMONE* UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) secara *in vitro* dan *in vivo* pada VEKTOR EKSPRESI L4440

Mahasiswa : Anggi Shestita Wulandari

Tesis (2010), Program studi Magister Bioteknologi SITH ITB, email: anggi.shestita@yahoo.com

Pembimbing : Dr.Adi Pancoro¹ dan Dr.Sony Suhandono²

1) SITH ITB, email: adi@sith.itb.ac.id

2) SITH ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Gelar : Magister Sains (M.Si), Wisuda Juli 2010

Abstrak

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan salah satu komoditas akuakultur unggulan Indonesia yang permintaannya di dunia meningkat setiap tahun. Oleh karena itu, peningkatan produksi telur udang windu di tempat budi daya menjadi penting dilakukan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah melalui teknik ablasi mata yang bertujuan untuk menstimulasi proses pematangan gonad. Akan tetapi teknik ini menyebabkan udang betina tidak dapat digunakan sebagai indukan lagi setelah melalui dua siklus *spawning* disamping kualitas telur yang semakin menurun. Permasalahan ini dapat dijawab dengan pendekatan RNA *interference* (RNAi), suatu teknologi yang dapat menghambat ekspresi *Gonad-Inhibiting Hormone* (GIH) sehingga menstimulasi pematangan gonad. Teknologi RNAi ini dilakukan dengan memproduksi *double-stranded* RNA (dsRNA) GIH secara *in vitro* dan *in vivo*. Produksi dsRNA diawali dengan mengisolasi RNA total udang windu dari batang mata dan ditranskripsi balik menggunakan iScriptTM cDNA Synthesis Kit. Fragmen GIH diperoleh dengan mendesain tiga pasang primer yang berada dalam daerah yang berpotensi menjadi *small-interfering* RNA (siRNA). Ketiga pasang primer ini digunakan untuk mengamplifikasi fragmen GIH melalui *touchdown* PCR. Produk dsRNA-GIH secara *in vitro* diperoleh melalui MEGAscript[®] RNAi kit. Produk dsRNA-GIH berukuran 271 pb yang diperoleh kemudian diinjeksikan pada dua ekor induk udang yang berumur 12-14 bulan. Injeksi ini tidak menyebabkan *spawning*, kemungkinan disebabkan dosis dsRNA-GIH yang terlalu rendah. Oleh karena itu, dsRNA dalam skala besar perlu diproduksi secara *in vivo*. Fragmen GIH yang telah diperoleh melalui *touchdown* PCR diligasi dengan vektor kloning pGEM[®] T-Easy. Fragmen GIH tersebut kemudian dipotong dengan enzim restriksi *Not1* untuk diligasikan dengan vektor ekspresi L4440. Bakteri *E.coli* HT115 selanjutnya ditransformasi dengan vektor ekspresi tersebut. Produk dsRNA-GIH yang terekspresi pada bakteri dengan induksi IPTG diisolasi menggunakan metode TRIzol yang dimodifikasi. Larik berukuran ± 750 pb menunjukkan dsRNA-GIH telah berhasil diisolasi dari bakteri transforman. Hasil sekuensing dan PCR transkripsi balik menunjukkan bahwa fragmen dsRNA-GIH telah berhasil dikonstruksi di dalam vektor ekspresi L4440.

Kata Kunci : *Penaeus monodon*, RNAi, *double-stranded* RNA, GIH