

## ANALISIS FILOGENETIK KEPITING BAKAU *Scylla olivacea* DENGAN BEBERAPA KRUSTASEA BERDASARKAN GEN PENYANDI FAME<sub>T</sub>

### *Phylogenetic Analysis of Mud Crab *Scylla olivacea* with Several Crustacean based on mRNA Encoding FAME<sub>T</sub>*

Sunarti<sup>1</sup>, Akbar Marzuki Tahya<sup>2</sup>, Ruqayyah Jamaluddin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Akuakultur, Fakultas Perikanan, Universitas Cokroaminoto Makassar, Makassar.

<sup>2</sup>Akuakultur, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Tadulako, Palu

Email: [nayusta@gmail.com](mailto:nayusta@gmail.com)

#### ABSTRAK

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi, dan sekuens basa nukleotida mRNA penyandi FAME<sub>T</sub> *Scylla olivacea*. Beberapa penelitian menuliskan bahwa urutan mRNA penyandi FAME<sub>T</sub> memiliki perbedaan pada spesies krustasea. Tujuan penelitian untuk mengetahui jarak kekerabatan *S. olivacea* dengan krustasea lainnya berdasarkan sekuens mRNA penyandi FAME<sub>T</sub>. Kesamaan sekuens mRNA penyandi FAME<sub>T</sub> menunjukkan beberapa krustasea yang memiliki kemiripan dengan sekuens mRNA FAME<sub>T</sub> *S. olivacea*. Analisis pohon filogeni menunjukkan adanya 2 kluster kekerabatan mRNA penyandi FAME<sub>T</sub> *S. olivacea* pada cabang yang sama dengan 2 spesies kepiting lainnya: *S. serrata* dan *S. paramamosain*. Selain pada genus *Scylla*, ditemukan pula pada *Portunus trituberculatus* dan *P. pelagicus* serta udang sungai *Macrobrachium rosenbergii*. Temuan tersebut menunjukkan bahwa kepiting *S. olivacea* monofiletik dengan 2 kepiting bakau lainnya, yaitu rajungan serta udang sungai *M. rosenbergii*. Sehingga menggambarkan hubungan kekerabatan yang sangat dekat secara genetik. Sementara pada cabang ke 2 terdiri atas krustasea jenis udang-udangan seperti *Homarus americanus*, *Cherax quadricarinatus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Metapenaeus ensis* dan *Litopenaeus vannamei*.

Kata kunci: enzim, FAME<sub>T</sub>, filogenetik, sekuens, kekerabatan.

#### ABSTRACT

Previous studies have successfully isolated and nucleotide base sequences for FAME<sub>T</sub> encoding *Scylla olivacea* mRNA. Several studies have noted that the FAME<sub>T</sub>-coding mRNA sequence has differences in crustacean species. The study aimed to determine the kinship distance of *S. olivacea* with other crustaceans based on the FAME<sub>T</sub>-encoding mRNA sequence. The similarity of FAME<sub>T</sub> encoding mRNA sequences showed that some crustaceans had similarities to the FAME<sub>T</sub> mRNA sequences of *S. olivacea*. Analysis of the phylogeny tree showed the presence of 2 mRNA kinship clusters encoding FAME<sub>T</sub> *S. olivacea* on the same branch as two other crab species: *S. serrata* and *S. paramamosain*. Apart from the genus *Scylla*, it was also found in *Portunus trituberculatus* and *P. pelagicus* and the river shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. These findings indicate that the *S. olivacea* crab is monophyletic with 2 other mangrove crabs, namely the tiny crab and the river shrimp *M. rosenbergii*. So, it describes a very close genetic relationship. At the same time, the second branch consists of crustaceans of crustaceans such as *Homarus americanus*, *Cherax quadricarinatus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Metapenaeus ensis*, and *Litopenaeus vannamei*.

Keywords: enzyme, FAME<sub>T</sub>, phylogenetic, sequence, genetic relationship.

## PENDAHULUAN

Farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) diketahui sebagai enzim yang bertanggung jawab dalam proses katalisis metil farnesoat (Hui *et al.*, 2010) melalui proses metilasi asam farnesoat (AF) menjadi metil farnesoat (MF) pada tahap akhir katalisis (Gunawardene *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010). Produk hormon yang dihasilkan berupa MF yang berperan dalam pertumbuhan krustasea (Borst *et al.*, 2001; Nagaraju, 2007) serta berperan dalam mengontrol perkembangan, morfogenesis dan reproduksi krustasea (Holford *et al.*, 2004). Lebih jauh, metil farnesoat juga memiliki peran menstimulasi perkembangan gonad dan produksi ekdisteroid di gonad, hepatopankreas, organ-Y, otak dan ganglia thorak (Nagaraju *et al.*, 2011). MF disintesis dan disekresikan oleh organ mandibular. Penyuntikan ekstrak kasar organ mandibular memperlihatkan peningkatan persentase molting dan pertumbuhan pada kepiting bakau *Scylla olivacea* fase intermolt (Tahya *et al.*, 2016).

Berdasarkan beberapa hasil penelitian yang telah dilaporkan, sekuen RNA penyandi FAMeT pada krustasea merupakan golongan multigen yang memiliki lebih dari satu bentuk (Gunawardene *et al.*, 2002; Ruddel *et al.*, 2003; Kuballa *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012). Pada RNA penyandi FAMeT juga tidak ditemukan adanya intron (Kuballa *et al.*, 2007). Perbedaan gen FAMeT terletak pada panjang sekuen DNA maupun RNA yang menyusunnya. Bentuk *long* memiliki panjang 703 susunan basa, *intermediate* 697 susunan basa dengan 6 delesi dari bentuk *long*, dan *short* 688 susunan basa dengan 15 bp delesi dari bentuk *long* pada kepiting bakau *S. serrata* (Kuballa *et al.*, 2007) dan pada *Scylla paramamosain*, sekuen mRNA FAMeT bentuk *long* terdiri atas 1215 susunan basa, *intermediate* 1209 susunan basa dan *short* sepanjang 1200 susunan basa (Yang *et al.*, 2012). Sementara pada udang dan lobster hanya memiliki 2 bentuk yaitu *long* dan *short* (Kuballa *et al.*, 2007).

Yang *et al.* (2012) mengemukakan bahwa RNA penyandi FAMeT diekspresikan pada berbagai organ kepiting *S. paramamosain* seperti hati, otot, otak, ganglion thorak, tangkai mata, perut, ovarium, hepatopankreas dan insang. Tiga bentuk RNA penyandi FAMeT (*long*, *intermediat* dan *short*) juga ditemukan terekspresi pada otak, tangkai mata, epidermis, organ mandibular, otot dan organ-Y pada juvenil rajungan *Portunus pelagicus* jantan selama fase *intermolt*, *pre molt*, *molt* dan *pos molt* (Kuballa *et al.*, 2007). Pada penelitian sebelumnya, kami telah melaporkan ekspresi RNA penyandi FAMeT pada organ mandibular kepiting bakau *S. olivacea* pada fase *intermolt* dan *pre molt* (Sunarti *et al.*, 2016).

Tingkat kesamaan sekuen parsial RNA penyandi FAMeT pada kepiting bakau *S. olivacea* telah kami paparkan pada tulisan sebelumnya dimana persentasi kesamaan dengan RNA penyandi FAMeT pada *S. paramamosain* dan *S. serrata* sebesar 98% serta 95–94% dengan spesies *Portunus pelagicus*. Pada tulisan ini, kami akan melaporkan hasil analisis perbedaan sekuen parsial RNA penyandi FAMeT *S. olivacea* dengan spesies krustasea lainnya yang sekuen RNA FAMeT nya telah didaftarkan pada *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) serta melihat jarak kekerabatannya berdasarkan sekuen RNA penyandi FAMeT melalui analisis filogeni.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dalam 2 tahap yaitu pada tahap pertama ekstraksi dan pengurutan basa nukleotida mRNA penyandi FAMeT yang dilaksanakan pada Desember 2013 hingga November 2014 di Laboratorium Pendidikan dan Layanan, Fakultas

Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Tahap ke 2 yaitu tahap analisis perbedaan sekuen mRNA penyandi FAMeT yang dilaksanakan pada Juli 2020.

### **Ekstraksi dan Sekuensing RNA penyandi FAMeT**

Proses ekstraksi dan sekuensing RNA penyandi FAMeT dijabarkan pada publikasi sebelumnya (Sunarti *et al.*, 2016). Total RNA kepiting bakau *S. olivacea* diperoleh menggunakan RNeasy Mini Kit (Qiagen), mengikuti petunjuk perusahaan. Kualitas hasil ekstraksi RNA diuji secara kuantitatif dan kualitatif. Uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Uji kualitatif dengan PCR menggunakan primer  $\beta$ -actin. Selanjutnya melakukan amplifikasi RNA penyandi FAMeT menggunakan kit SuperScript III OneStep RT-PCR with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen) sesuai petunjuk perusahaan.

Primer spesifik FAMeT yang digunakan adalah FAMeTQ15'GGCACGGACGAGAACAA-3' dan FAMeTQ2 5'-GCGACGCTGAAGGAGAT-3' dengan panjang amplifikasi 450 bp (Kuballa *et al.*, 2007). Hasil *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) selanjutnya divisualisasi menggunakan gel agarose 1.5% untuk RNA FAMeT dan 2% untuk  $\beta$ -actin dalam buffer TAE 1 $\times$  dengan menggunakan pewarna ethidium bromide 0.5  $\mu$ g/ml. Selanjutnya, dilakukan isolasi cDNA pada gel dengan cara memotong gel pada bagian yang terdapat pendaran pita cDNA kemudian dilusi menggunakan kit NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) sesuai petunjuk perusahaan. Setelah cDNA FAMeT murni diperoleh, dilakukan proses pengurutan oligonukleotida (*sequencing*) oleh PT. Genetika Science Jakarta dan 1<sup>st</sup> Base Malaysia.

### **Analisis Urutan Oligonukleotida cDNA Penyandi FAMeT**

Urutan oligonukleotida cDNA penyandi FAMeT yang diperoleh dianalisis tingkat perbedaannya dengan urutan oligonukleotida penyandi FAMeT krustasea lainnya menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Data urutan oligonukleotida cDNA penyandi FAMeT pada krustasea lainnya diperoleh dari *GenBank*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sementara untuk membuat pohon filogenetik guna mengetahui jarak kedekatan berdasarkan gen parsial penyandi FAMeT dilakukan dengan melalui proses *alignment* menggunakan program Clustal W kemudian dilanjutkan dengan *Neighbour-joining* pada *software* Mega5.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil *sequencing* cDNA penyandi FAMeT diperoleh urutan oligonukleotida sepanjang 450 basa (Gambar 1). Urutan basa nukleotida yang diperoleh tersebut merupakan sekuen parsial yang artinya hanya sebagian dari total keseluruhan basa yang menyusun mRNA FAMeT pada *S. olivacea*. Panjang keseluruhan sekuen mRNA penyandi FAMeT pada kepiting bakau *S. serrata* adalah bentuk *long* sepanjang 703 susunan basa, *intermediate* 697 susunan basa dan *short* sepanjang 688 susunan basa (Kuballa *et al.*, 2007). Sementara pada *S. paramamosain* adalah bentuk *long* sepanjang 1215 susunan basa, *intermediate* 1209 susunan basa dan *short* 1200 susunan basa (Yang *et al.*, 2012). Sekuen parsial yang diperoleh tersebut juga belum bisa digunakan untuk mengetahui jenis sekuennya apakah termasuk dalam kategori *long*, *intermediet* maupun *short*. Hasil sekuensing tersebut kemudian dilakukan penjajaran atau pencarian sekuen yang memiliki kesamaan dengan sekuen mRNA penyandi FAMeT *S. olivacea* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

```

NNNGGTCGCC TCACGGCAGA CTCTTCGCTT CCAGGTCAAG GCGGCGCACG ACTGTCATGT
GGCATTACCC ACCGGCGCCG AGGAGACCGA CCCGATGGTG GAAGTGTTCA TTGGTGGCTG
GGAGGGCGCC GCCTCTGCCA TCAGGTTCAA GAAAGCCGAC GACCTGGTGA AGGTGGACAC
TCCGGACATC GTGACAGAGG CAGAGTACCG CGAGTTCTGG ATTGCCGTGG ACCATAACGA
AGTGCGCGTG GGCAAGGCTG GGGAGTGGGA GCCCCTCATG CAGGCACCCA TCCCGGAGCC
CTTCGAGATC ACCCACTACG GCTACTCTAC TGGCTGGGGA GCGACTGGCT GGTGGAAGTT
CCTGAACGAC AGGGTACTAA ACACGGAGGA CTGTCTCACC TACAACCTCG AGCCTGTCTA
CGGTGACTCC ATCTCCTTCA GCGTCGCAA

```

Gambar 1. Urutan basa oligonukleotida cDNA penyandi FAMeT sepanjang 450 bp pada *S. olivacea*.

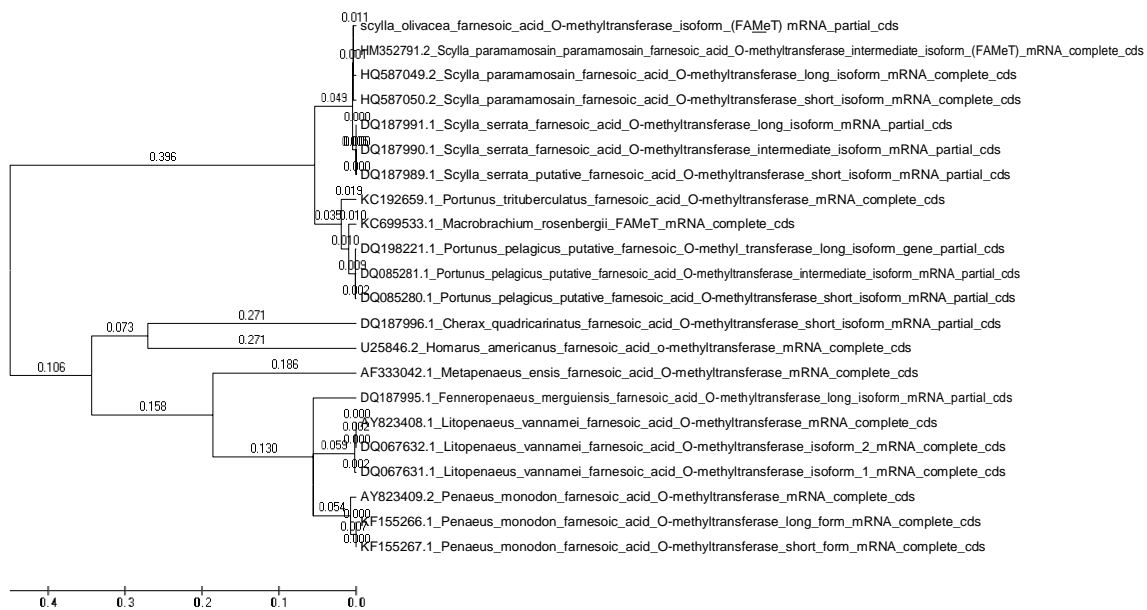
Program BLAST akan membandingkan sekuen nukleotida atau protein pada database sekuen dan menghitung kecocokannya secara statistik (Pangestika *et al.*, 2015). Analisis kesejajaran tersebut bertujuan untuk mencocokkan karakter yang homolog, yaitu karakter yang mempunyai nenek moyang yang sama (Kemena dan Notredame, 2009). Hasil kesejajaran sekuen mRNA penyandi FAMeT menunjukkan beberapa krustasea yang memiliki kemiripan dengan sekuen mRNA FAMeT *S. olivacea* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis tingkat kesejajaran mRNA penyandi FAMeT kepiting bakau *S. olivacea* dengan beberapa krustasea menggunakan program BLAST.

Deskripsi	Identik (%)	Nomor akses
<i>S. paramamosain</i> short isoform mRNA, complete cds.	98.63%	HQ587050.2
<i>S. paramamosain</i> intermediet isoform mRNA, complete cds.	98.63%	HM352791.2
<i>S. paramamosain</i> long isoform mRNA, complete cds.	98.63%	HQ587049.2
<i>S. serrata</i> short isoform mRNA, complete cds.	98.40%	DQ187989.1
<i>S. serrata</i> intermediet isoform mRNA, complete cds	98.40%	DQ187990.1
<i>S. serrata</i> long isoform mRNA, complete cds	98.40%	DQ187991.1
<i>Portunus trituberculatus</i> mRNA, complete cds	93.82%	KC192659.1
<i>Portunus pelagicus</i> short isoform gene, partial cds.	92.91%	DQ085280.1
<i>Portunus pelagicus</i> intermediet isoform gene, partial cds.	93.14%	DQ085281.1
<i>Portunus pelagicus</i> long isoform gene, partial cds.	93.14%	DQ198221.1
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> FAMeT mRNA, complete cds	93.44%	KC699533.1
<i>Metapenaeus ensis</i> mRNA, complete cds	76.74%	AF333042.1
<i>Fenneropenaeus merguensis</i> mRNA long isoform, partial Cds	77.00%	DQ187995.1
<i>Cherax quadricarinatus</i> short isoform mRNA, partial cds	76.65%	DQ187996.1
<i>Homarus americanus</i> mRNA, complete cds	77.08%	U25846.2
<i>Litopenaeus vannamei</i> mRNA, complete cds	75.24%	AY823408.1
<i>Litopenaeus vannamei</i> isoform 2 mRNA, complete cds	75.24%	DQ067632.1
<i>Litopenaeus vannamei</i> isoform 1 mRNA, complete cds	75.24%	DQ067631.1
<i>Penaeus monodon</i> long form mRNA, complete cds	76.70%	KF155266.1
<i>Penaeus monodon</i> short form mRNA, complete cds	76.70%	KF155267.1
<i>Penaeus monodon</i> mRNA, complete cds	74.64%	AY823409.2

Berdasarkan Tabel 1 tersebut, terdapat 11 jenis spesies krustasea yang memiliki kemiripan dengan sekuen mRNA penyandi FAMeT *S. olivacea* dengan persentasi

homologi yang cukup tinggi. Persentase kemiripan berkisar antara 98%–74% dimana krustasea jenis kepiting bakau *S. paramamosain* dan *S. serrata* yang masih satu genus dengan *S. olivacea* menempati urutan tertinggi yaitu sebesar 98% kemudian disusul oleh rajungan *P. trituberculatus* dan *P. pelagicus* sebesar 93–92%. Sementara krustasea jenis udang dan lobster hanya memiliki nilai kemiripan dengan sekuen mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* pada kisaran 77–74%. Nilai tersebut menggambarkan bahwa jarak kekerabatan antara *S. olivacea* dengan 2 spesies kepiting lainnya yaitu *S. paramamosain* dan *S. serrata* serta rajungan masih sangat dekat. Sementara dengan krustasea jenis udang dan lobster memiliki jarak kekerabatan yang sudah cukup jauh. Hasil tersebut kemudian direfleksikan ke dalam bentuk pohon filogeni untuk melihat klasifikasi kekerabatan secara genetik yang terjadi (Gambar 2.).



Gambar 2. Pohon filogeni beberapa krustasea berdasarkan sekuen mRNA penyandi FAMEt menggunakan metode *neighbor-joining*.

Pohon filogenetik dapat memberikan informasi tentang pengklasifikasian populasi berdasarkan hubungan evolusionernya (Dharmayanti, 2011). Kontruksi pohon filogenetik dapat dilakukan dengan metode *neighbor-joining* yang merupakan salah satu dari 2 kategori yang digunakan sebagai strategi untuk menghasilkan pohon filogenetik terbaik dengan cara memeriksa hubungan topologi lokal dari pohon dan mengkonstruksi pohon terbaik dengan langkah demi langkah (Dharmayanti, 2011). Selanjutnya ditambahkan bahwa *neighbor-joining* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen. Pohon filogenetik mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* memperlihatkan adanya 2 klaster atau cabang kekerabatan. mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* berada pada cabang yang sama dengan 2 jenis kepiting lainnya yaitu *S. serrata* dan *S. paramamosain*. Selain itu, terdapat juga rajungan *P. trituberculatus* dan *P. pelagicus* serta udang sungai *M. rosenbergii*. Ini menunjukkan bahwa kepiting *S. olivacea* monofiletik dengan 2 kepiting bakau lainnya, rajungan serta udang sungai *M. rosenbergii*. Hal tersebut menggambarkan hubungan kekerabatan yang sangat dekat secara genetik. Sebuah kelompok dimana anggotanya memiliki banyak kesamaan dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat dan diperkirakan diturunkan dari satu nenek moyang (Hidayat dan Adi, 2008). Sementara

pada cabang ke 2 terdiri atas krustasea jenis udang-udangan seperti *Homarus americanus*, *Cherax quadricarinatus*, *Fenneropenaeus merguensis*, *Metapenaeus ensis* dan *Litopenaeus vannamei*. Prinsip untuk menganalisis filogenetik adalah penggunaan skor jarak antara dua sekuen atau lebih. Skor diantara dua sekuen adalah jumlah posisi yang tidak cocok/*mismatch* dalam penjejeran (Dharmayanti, 2011). Panjang cabang pada klaster 1 sebesar 0.396, namun cabang yang menghubungkan setiap organisme dalam klaster sangat dekat. Sementara pada klaster 2 panjang cabang sebesar 0.106 tetapi jarak antara anggota klaster cukup panjang dan bervariasi. Semakin besar nilai panjang cabang maka terdapat lebih banyak perubahan sekuen yang terjadi (Hall, 2011).

## PENUTUP

Hasil penjejeran menggunakan BLAST menunjukkan bahwa terdapat 11 jenis krustasea yang memiliki sekuen mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* dengan persentasi homologi yang cukup tinggi yaitu berkisar antara 98%–74%. Analisis pohon filogenetik mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* memperlihatkan adanya 2 klaster kekerabatan. mRNA penyandi FAMEt *S. olivacea* berada pada cabang yang sama dengan *S. serrata*, *S. paramamosain*, *P. trituberculatus*, *P. pelagicus* dan *M. rosenbergii*. Sementara pada klaster ke 2 terdiri atas krustasea jenis udang-udangan seperti *Homarus americanus*, *Cherax quadricarinatus*, *F. merguensis*, *Metapenaeus ensis* dan *L. vannamei*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis hanturkan kepada Ibu Prof. Dr. drh. Retno Damayanti Soejoedono, MS. serta Ibu Dr. drh. Ni Luh Putu Ika Mayasari selaku pembimbing dan kepala Laboratorium Pendidikan dan Layanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor yang telah banyak memberikan masukan serta bantuan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Borst, D. W., Ogan, J. T., Tsukimura, B., Claerhout, T., & Holford, K. C. (2001). Regulation of the Crustacean Mandibular Organ. *Am. Zool*, 41(3), 430-441.
- Dharyamanti, I. N. L. P. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*, 1(21), 1-10.
- Gunawardene., & Silva, Y. I. N. (2002). Molecular Characterization, Expression, Cellular Distribution and Functional Analysis of the Shrimp (*Metapenaeus ensis*) Farnesoic acido-methyltransferase: a Novel Enzyme in the Biosynthetic Pathway of Methyl Farnesoate. <http://sunzi.lib.hku.hk/hkuto/record/B2997902X>.
- Hall, B. G. (2001). *Phylogenetic Trees Made Easy: A How - To Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates.
- Hidayat T., & Adi, P. (2008). Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Angrek. *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), 35–40.
- Holford, K. C., Edwards, K. A., Bendena, W. G., Tobe, S. S., Wang, Z., & Borst, D. W. (2004). Purification and Characterization of a Mandibular Organ Protein From the American Lobster, *Homarus americanus*: a Putative Farnesoic Acid O-methyltransferase. *Ins BiochemMol Biol*, 34(8), 785-798.

- Hui, J. H. L., Hayward, A., Bendena, W. G., Takahasi, T., & Tobe, S. S. (2010). Evolution and Functional Divergence of Enzymes Involved in Sesquiterpenoid Hormone Biosynthesis in Crustaceans and Insects. *Science Direct*, 31(3), 451-455.
- Kuballa, A. V., Guyatt, K., Dixon, B., Thaggard, H., Ashton, A. R., Paterson, B., Merritt, D. J., & Elizur, A. (2007) Isolation and Expression Analysis of Multiple Isoforms of Putative Farnesoic Acid O-methyltransferase in Several Crustacean Species. *G Comp Endoc*, 150(1), 48-58.
- Kemena, C., & Notredame, C. (2009). Upcoming Challenges for Multiple Sequence Alignment Methods in the High Throughput Era. *Bioinformatics*, 25, 2455-2465.
- Liu, S., Zhang, C., Yang, B., Gu, J., & Liu, Z. (2010) Cloning and Characterization of a Putative Farnesoic Acid O-methyltransferase Gene From the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J Ins Scien*, 10(103), 1-11.
- Nagaraju, G. P. C. (2007). Review article: Is Methyl Farnesoate a Crustacean Hormone. *Aquaculture*, 272(4), 39-54.
- Nagaraju, G. P. C. (2011). Review article: Reproductive Regulators in Decapod Crustaceans: an Overview. *Exp Biol*, 214(1), 3-6.
- NCBI. (2015). BLAST®. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Diakses: 10 Agustus 2020.
- Pangestika, Y., Budiharjo, A., & Kusumaningrum, H. P. (2015). Analisis Filogenetik *Curcuma zedoaria* (Temu Putih) Berdasarkan Gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Jurnal Biologi*, 4(4), 8-13.
- Ruddell, C. J., Wainwright, G., Geffen, A., White, M. R. H., Webster, S. G., & Rees, H. H. (2003). Cloning, Characterization, and Developmental Expression of a Putative Farnesoic Acid O-Methyl Transferase in the Female Edible Crab *Cancer pagurus*. *Biol. Bull*, 205(1), 308-318.
- Sunarti, Y., Soejoedono, R. D., Mayasari, N. L. P., & Tahya, A. M. (2016). RNA Expression of Farnesoic Acid O-Methyl Transferase in Mandibular Organ of Intermolt and Premolt Mud Crabs *Scylla olivacea*. *AAFL Bioflux*, 9(2), 270-275.
- Tahya, A. M., Zairin, M. J. R., Boediono, A., Artika, I. M., & Suprayudi, M. A. (2016). Important Role of Mandibular Organ in Molting, Growth, and Survival of Mud Crab *Scylla olivacea*. *International Journal of Chemtech Research*. 9(12), 529-533.
- Yang, Y., Haihui, Y., Huang, H., Jin, Z., & Li, S. (2012). Cloning, Expression and Functional Analysis of Farnesoic Acid O-methyltransferase (FAMET) in the Mud Crab, *Scylla paramamosain*. *Marin Freshwat Behav Physiol*, 45(3), 209–222.