



KERAGAMAN GENETIK UDANG GALAH
(Macrobrachium rosenbergii de Man) DARI BEBERAPA DAERAH DI
SULAWESI SELATAN DENGAN *RESTRICTION FRAGMENT LENGTH*
POLYMORPHISM (RFLP)

OLEH:

PRABAWATI

H 411 01 036



| | |
|------------------|---------------|
| Tgl. Pengantar | 11/07/06. |
| Tempat Pengantar | Fak. MIPA. |
| Jumlah Lembar | 1 (Jalu) EFR. |
| Nilai | H |
| Revisi | 706/11-07-06. |

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006

SKRIPSI

OLEH :
PRABAWATI
H41101036

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006

**KERAGAMAN GENETIK UDANG GALAH
(*Macrobrachium rosenbergii* de Man) DARI BEBERAPA DAERAH
DI SULAWESI SELATAN DENGAN *RESTRICTION FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM* (RFLP)**

**OLEH :
PRABAWATI
H41101036**

*SKRIPSI INI DIBUAT UNTUK MELENGKAPI TUGAS DAN MEMENUHI SYARAT
UNTUK MEMPEROLEH GELAR SARJANA SAINS BIOLOGI*

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2006

HALAMAN PENGESAHAN


**KERAGAMAN GENETIK UDANG GALAH
(*Macrobrachium rosenbergii* de Man) DARI BEBERAPA DAERAH
DI SULAWESI SELATAN DENGAN *RESTRICTION FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM* (RFLP)**

OLEH :
PRABAWATI
H411 01 036

Disetujui oleh
Pembimbing Utama


(Dra. Rosana Agus, M.Si.)
NIP. 131 959 055

Pembimbing Pertama


(Irma Andriani, S.Pi, M.Si.)
NIP. 132 240 509

Pembimbing Kedua


(Dasu Rohmana S.Pi., M.Si.)
NIP. 080 125 824

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur kehadiran Allah SWT, Tuhan Semesta Alam yang telah memberikan nikmat dan rahmat-Nya kepada penulis sehingga skripsi dengan judul “Keragaman Genetik Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) Dari Beberapa Daerah di Sulawesi Selatan dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)” ini dapat diselesaikan.

Shalawat dan salam penulis haturkan kepada junjungan alam Nabi Besar Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat yang telah membimbing kita dari jalan yang kelam ke jalan yang diridhoi Allah SWT.

Dengan terselesaikannya skripsi ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tuaku tercinta: Ayahanda Rusdiasih, S.Pd dan Ibunda Kartini atas curahan kasih sayang yang tiada tara kepada penulis serta semua yang telah diberikan yang tak mampu untuk dibahasakan. Kepada saudara-saudaraku yang sangat kusayangi Rahayu Artianingsih, Kukuh Manulung dan Amir Hamdani atas motivasi, kasih sayang, kepercayaan dan kebanggaan kepada penulis.

Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

↓ Ibu Dra. Rosana Agus, M.Si. selaku pembimbing utama, Ibu Irma Andriani S.Pi., M.Si. selaku pembimbing I dan Bapak Dasu Rohmana, S.Pi. selaku pembimbing

II atas masukan dan bimbingannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

- ↓ Penasehat akademisku Ibu Irma Andriani S.Pi., M.Si. atas bimbingan dan nasehat serta bantuannya selama ini.
- ↓ Bapak Dr. Estu Nugroho, M.Sc. selaku Kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor atas fasilitas dan izinnya melaksanakan penelitian di BRPBAT Sempur-Bogor.
- ↓ Dinas Kelautan dan Perikanan Propinsi Sulawesi Selatan atas bantuan dana penelitian.
- ↓ Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc., Bapak Drs. Andi Ilham Latunra, M.Si., Ibu Nurhaedar, S.Si.,M.Si., dan Ibu Dra. Risco B. Gobel, M.S. selaku tim penguji atas masukan berupa saran dan kritik yang sangat membangun bagi penulis.
- ↓ Untuk Ketua Jurusan Biologi Drs. Karunia Alie, M.Si. dan seluruh Bapak dan Ibu dosen Biologi atas segala ilmu dan pengetahuan yang telah diberikan kepada kami selama dibangku kuliah.
- ↓ Kepada seluruh pegawai Jurusan Biologi Pak Ahmad, Pak Kama', Pak Tiar, Pak Mincong dan Pak Rahman di kasubag kemahasiswaan atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.
- ↓ Kepada Ibu Irmawati, Bapak Otong Zainal Arifin, *Mba'* Titin Kurniasih dan *Mba'* Yesi, atas masukan dan bantuannya kepada penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi ini.

- ↓ Kepada *Mba'* Ani dan keluarga di Suka Bumi No. 23 dan *Om* Sutaji sekeluarga di BTP Blok H, Terima kasih telah menjadikan penulis sebagai bagian dari keluarga di Makassar, adik-adikku Fadhly, Linda, Lia dan Fahrul, terima kasih atas keceriaan dan kasih sayang selama ini.
- ↓ Rekan seperjuanganku Handayani Halik atas kebersamaan dalam suka dan duka, dorongan semangat, motivasi dan bantuannya selama ini.
- ↓ Kepada seluruh saudara-saudaraku angkatan 2001, Ila, Anita, Ondo', Suba, Ichal, Tuty, Iqha, Celi, Pepen, Sadly, Itha, Rima, Hikmah, Ipul, Urhy, Uda', Marni, Fates, Syumi, Tika, Santi, Temma, Nining, Ani U, Khalid, Opick, Wirda, Treys, Femmy, Titis&Deva, Nurul, Tini S, Tini B, Ani A, Yus, Alma, Misna, dan Andhys atas persahabatan dan kebersamaan yang indah selama ini.
- ↓ Untuk kanda-kanda senior dan adik-adik junior yang telah menjadi bagian dari keluargaku di bawah naungan Keluarga Besar Mahasiswa Biologi FMIPA UNHAS.
- ↓ Kepada Anti dan Keluarga di Bulukumba, Ema dan Keluarga di Malili, Kak Hamzah dan Pak Sofyan atas bantuannya selama proses pengambilan sampel.

Penulis sadar, bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, kritik dan saran untuk perbaikan skripsi ini sangat penulis harapkan.

Penulis



Abstract

The research about genetic variants of giant freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) from some areas in South Sulawesi was held in Research Institute for Agriculture Sempur, Bogor. The research was conducted to know the genetic variants of giant freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) in South Sulawesi by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). The shrimp were collected from Malili, Bone, Makassar and Bulukumba. The result showed that the band gene of shrimp from Bulukumba more polymorphic than other. It was indicated that genetic variants of the giant freshwater shrimp from Bulukumba was higher than the giant freshwater shrimp from Malili, Bone and Makassar.

Key words : Giant freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*, RFLP, genetic variants

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| JUDUL SKRIPSI | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| ABSTRAK | vii |
| ABSTRACT | viii |
| DAFTAR ISI..... | ix |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiv |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| I.1 Latar Belakang..... | 1 |
| I.2 Tujuan Penelitian | 3 |
| I.3 Manfaat Penelitian | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 3 |
| II.1 Klasifikasi Udang Galah (<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man) | 4 |
| II.2 Morfologi Udang Galah | 4 |
| II.3.Migrasi <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | 7 |

| | |
|--|-----------|
| II.4 Siklus Hidup Udang Galah (<i>M. Rosenbergii</i>)..... | 8 |
| II.5 Penentu Keragaman Genetik | 10 |
| II.6 Isolasi DNA..... | 12 |
| II.7 Struktur DNA Mitokondria (mtDNA)..... | 15 |
| II.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)..... | 17 |
| II.9 Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP) | 20 |
| BAB III METODOLOGI PENELITIAN..... | 22 |
| III.1 Waktu dan Tempat..... | 22 |
| III.2 Waktu dan Tempat Pengambilan Sampel..... | 22 |
| III.3 Alat Penelitian..... | 22 |
| III.3.1 Ekstraksi dan Isolasi Genom Total..... | 22 |
| III.3.2 PCR..... | 22 |
| III.3.3 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Retriksi..... | 22 |
| III.3.4 Elektroforesis Gel Agarose..... | 23 |
| III.4 Bahan penelitian..... | 23 |
| III.4.1 Ekstraksi dan Isolasi Genom Total..... | 23 |
| III.4.2 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Retriksi..... | 23 |
| III.4.3 Elektroforesis Gel Agarosa..... | 23 |
| III.5 Cara Kerja..... | 23 |
| III.5.1 Kriteria sampel..... | 23 |
| III.5.2 Ekstraksi dan isolasi genom total..... | 24 |
| III.5.3 Penggandaan Ruas D-loop mtDNA dengan PCR..... | 25 |



| | |
|--|----|
| III.5.4 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Retriksi..... | 26 |
| III.6 Analisis data | 27 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 28 |
| IV.1 Ekstraksi DNA..... | 28 |
| IV.2 Amplifikasi mtDNA..... | 29 |
| IV.3 Pemotongan dengan enzim restriksi..... | 30 |
| BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 37 |
| V.1 Kesimpulan..... | 37 |
| V.2 Saran..... | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 38 |
| LAMPIRAN-LAMPIRAN..... | 42 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 1. Jenis enzim restriksi yang digunakan untuk memotong mtDNA udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 26 |
| Tabel 2. Enzim restriksi dan situs pemotongan mtDNA udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 30 |
| Tabel 3. Hasil potongan produk amplifikasi 600 bp dengan enzim restriksi..... | 33 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 1. Morfologi Udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 5 |
| Gambar 2. Udang galah jantan dan udang galah betina..... | 7 |
| Gambar 3. Siklus hidup udang galah dan habitatnya..... | 9 |
| Gambar 4. Struktur DNA mitokondria (mtDNA)..... | 16 |
| Gambar 5. Tahapan PCR..... | 17 |
| Gambar 6. Elektroforegram hasil ekstraksi DNA total udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 28 |
| Gambar 7. Pola pita tunggal hasil amplifikasi mtDNA udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 29 |
| Gambar 8. Profil RFLP udang galah (<i>M. rosenbergii</i>) dengan enzim <i>Hae</i> III..... | 31 |
| Gambar 9. Profil RFLP udang galah (<i>M. rosenbergii</i>) dengan enzim <i>Taq</i> I..... | 31 |
| Gambar 10. Profil RFLP udang galah (<i>M. rosenbergii</i>) dengan enzim <i>Rsa</i> I..... | 32 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|--|----|
| Lampiran 1. | Skema kerja | 42 |
| Lampiran 2. | Bahan-bahan yang digunakan untuk larutan..... | 44 |
| Lampiran 3. | Lokasi pengambilan sample udang galah (<i>M. rosenbergii</i>)..... | 46 |
| Lampiran 4. | Sampel udang galah (<i>Macrobrachium rosenbergii</i> de Man)..... | 48 |

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Udang merupakan komoditi ekspor perikanan yang sangat penting bagi banyak negara berkembang, karena nilainya yang cukup baik dalam pemasaran internasional. Udang bernilai ekonomi tinggi, hewan ini diperdagangkan terutama untuk dagingnya yang lezat dan mengandung protein hewani yang bermutu. Limbahnya juga dapat digunakan sebagai pakan ternak yang berkualitas. Oleh karena itu banyak jenis udang yang dibudidayakan dan diusahakan secara besar-besaran di berbagai negara. Indonesia termasuk salah satu negara berkembang yang memiliki sumber daya udang yang cukup besar, baik dari jenis udang laut maupun udang air tawar. Bagi Indonesia, udang menjadi salah satu sumber devisa nonmigas dari sektor perikanan (Anonim, 1980 ; Anonim, 1994; Ipindhari, 1987). Berdasarkan data Departemen Kelautan dan Perikanan tahun 2002 bahwa volume dan nilai ekspor udang tahun 1991-2000 masing-masing meningkat rata-rata sebesar 1,97% dan 2,67% per tahun (Anonim, 2005). Berdasarkan distribusi geografisnya dapat diprediksi bahwa Indonesia menjadi *centre of origin* (habitat asli) dari salah satu komoditi udang yaitu udang galah, karena terdapat 19 spesies dari marga *Macrobrachium* (udang galah) (Hadie dan Hadie, 2002).

Di Indonesia kebutuhan akan udang galah lebih banyak dipenuhi dari usaha budi daya sehingga dibutuhkan jumlah benih yang semakin meningkat seiring dengan



peningkatan hasil. Benih-benih yang digunakan dalam usaha budidaya udang di Indonesia sebagian besar berasal dari alam. Keunggulan induk yang berasal dari alam menurut Sugama (2002) akan menghasilkan keturunan yang lebih besar, lebih produktif, dan memiliki ketahanan hidup yang lebih baik. Pada beberapa penelitian di bidang perikanan menunjukkan bahwa induk dari alam pada beberapa daerah yang berbeda memiliki keragaman genetik.

Keragaman genetik diperlukan oleh setiap spesies untuk menjaga vitalitas reproduksi, ketahanan terhadap penyakit dan kemampuan beradaptasi pada perubahan lingkungan. Keragaman genetik merupakan bahan baku bagi program pemuliaan mengingat besarnya keragaman dapat meningkatkan kemampuan beradaptasi suatu populasi jasad hidup terhadap perubahan lingkungan (Iranawati, 2002).

Keragaman udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dapat dilihat secara genetis dan morfologis. Pengamatan variasi genetik tersebut dapat dilakukan melalui bermacam analisa salah satunya dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki beberapa keunggulan yang lebih dibandingkan dengan isozym sebagai penanda molekuler karena jumlah dari penanda RFLP efektifitasnya tidak terbatas (Kuswinanti, 2001).

Dalam bidang perikanan, teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) telah berhasil diterapkan pada mitokondrial DNA (mtDNA) untuk mengidentifikasi keragaman genetik, karena mtDNA memiliki kecepatan evolusi yang tinggi dibandingkan dengan DNA inti, ukurannya kecil, diwariskan secara

maternal dan tanpa rekombinasi (Moritz *et al.*,1987). Sifat-sifat tersebut menyebabkan DNA mitokondria dapat dimanfaatkan untuk menentukan keragaman genetik antar individu dalam suatu populasi (Toha, 2001). mtDNA dipilih karena jumlah molekulnya yang sangat banyak dalam tiap sel, sehingga sekalipun sampel dalam keadaan yang buruk tetapi kemungkinan keberhasilan amplifikasinya akan lebih tinggi dibandingkan dengan DNA inti (Ngili, 2003).


Keragaman yang bersifat genetik dapat bermanfaat dalam usaha memperbaiki kualitas genetik udang bagi keperluan budidaya di tambak melalui kegiatan seleksi atau pemuliaan. Untuk merancang suatu program manajemen pembenihan udang yang dapat menghasilkan benih berkualitas secara berkesinambungan dengan tetap memperhatikan kaidah-kaidah konservasi jenis, maka informasi tentang keragaman genetik diperlukan.

I.2 Tujuan Penelitian

Mengetahui variasi genetik udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) dari beberapa daerah di Sulawesi Selatan dengan menggunakan metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

I.3 Manfaat penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi dasar dalam program pemuliaan udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) di Sulawesi Selatan.



BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

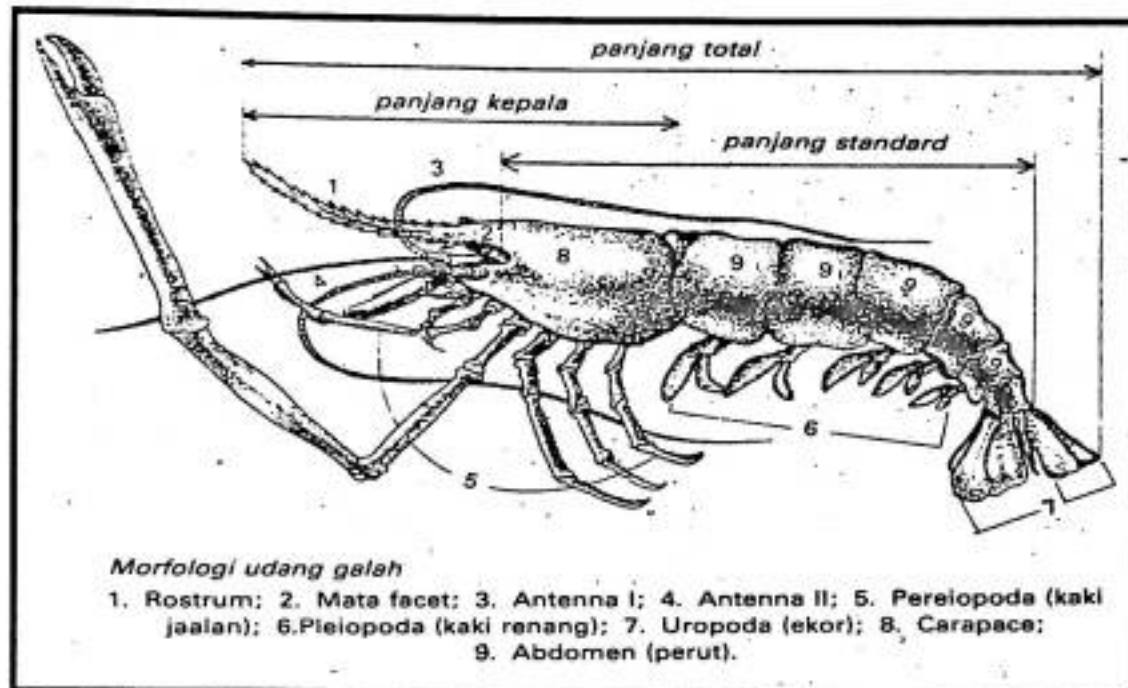
II.1 Klasifikasi udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man)

Klasifikasi Udang galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) dalam Hadie dan Hadie (2002) :

- Filum : Arthropoda
- Kelas : Crustacea
- Sub kelas : Malacostraca
- Bangsa : Decapoda
- Suku : Palaemonidae
- Anak suku : Palaemoninae
- Marga : *Macrobrachium*
- Jenis : *Macrobrachium rosenbergii* de Man

II.2 Morfologi

Tubuh udang agak berbentuk silindris memanjang dengan ruas-ruas pada perut dan anggota alat gerak nampak jelas. Tubuh udang dibungkus oleh kulit berkitin keras dan mengandung zat kapur kecuali pada batas ruas-ruasnya (Anonim, 1994). Badan udang terdiri atas kepala dan dada yang disebut cephalotorax, badan (abdomen), serta ekor (uropoda). Udang galah mempunyai ciri khusus dibandingkan dengan jenis udang lainnya, yakni kedua kakinya tumbuh dominan (Hadie dan Hadie, 2002).



Gambar 1. Morfologi Udang Galah (*M. rosenbergii*) (Soetarno,1992)

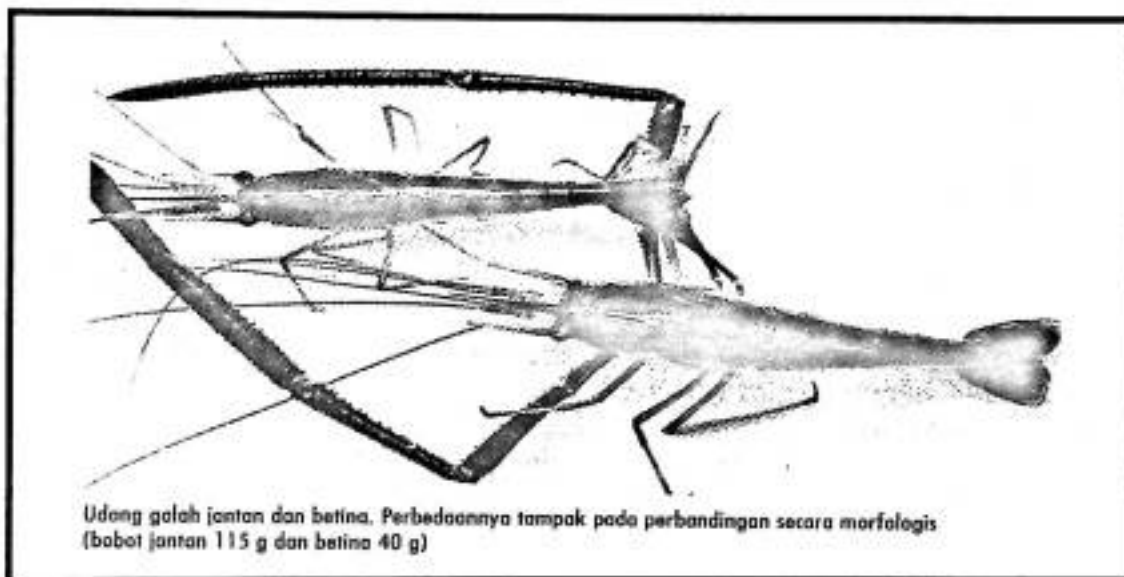
Menurut Soetarno (1992) dijelaskan bahwa cephalotorax dibungkus oleh kulit keras (carapace). Pada bagian kepala terdapat penonjolan carapace yang bergigi dan disebut rostrum. Walaupun kegunaan yang pasti belum dapat dijelaskan namun bila dilihat secara taksonomis rostrum tersebut mempunyai fungsi yang besar, yaitu sebagai penunjuk jenis (spesies). Udang galah mempunyai 11-13 buah gigi rostrum di bagian atas dan 8-14 buah gigi rostrum di bagian bawah. Inilah yang membedakan dengan jenis lain pada udang air tawar. Mulutnya dilengkapi juga dengan tiga pasang kaki rahang yang berfungsi sebagai penghancur dan penghisap makanan. Sapitnya atau tiga pasang kaki jalan bagian depan berfungsi sebagai pemegang dan penghantar pakan ke mulut (Anonim, 1994). Pada bagian depan kepala-dada terdapat sepasang mata bertangkai, dua pasang sungut dan mulut. Matanya terletak di pangkal rostrum, pasangan sungut pertama dinamakan antenula berfungsi sebagai alat peraba dan

pencium, masing-masing sungut bercabang dua langsing. Pasangan sungut kedua yang disebut antena, berfungsi sebagai alat perasa dan peraba, setiap antena bercabang dua disetiap pangkalnya (Anonim, 1994). Pada bagian dada terdapat 5 pasang kaki jalan (pereipoda). Pada udang galah pasangan kaki jalan yang kedua tumbuh sangat besar dan bahkan dapat mencapai $1\frac{1}{2}$ kali panjang badan. Ciri ini sangat khas terutama pada udang jantan, sedangkan pada betina pertumbuhan kaki tidak terlalu besar. Bagian badan terdiri atas lima ruas, masing-masing dengan sepasang kaki renang. Pada udang betina tempat tersebut merupakan tempat pengeraman telur (*brood chamber*) setelah telur dibuahi, sedang udang jantan terdapat appendix masculina. Bagian ekor (uropoda) merupakan ruas terakhir dari ruas badan yang kaki renangnya bermodifikasi uropoda (exopoda dan endopoda) dan diakhiri dengan telson.

Secara morfologis dan anatomis udang jantan dapat dibedakan dengan udang betina. Udang jantan dapat mencapai ukuran tubuh yang lebih besar dari pada udang betina. Pasangan kaki jalan yang kedua tumbuh sangat besar dan kuat, bahkan sampai $1\frac{1}{2}$ kali panjang total badannya. Bagian perut lebih ramping, ukuran pleuron lebih pendek. Alat kelamin terletak pada basis pasangan jalan kelima, dimana pasangan kaki ini terlihat lebih rapat dan lunak. Appendix masculina terletak pada pasangan kaki renang kedua yang merupakan cabang ketiga dari kaki renang tersebut; udang betina memiliki ukuran tubuh biasanya lebih kecil dari pada udang jantan. Pasangan kaki jalan kedua tetap tumbuh lebih besar, namun tidak begitu besar dan kuat seperti pada udang jantan. Bagian perut tumbuh melebar. Pleuron memanjang sehingga ruangan



pada bagian ini lebih dalam. Bersama-sama dengan kaki renang, ruangan ini merupakan tempat pengeraman telur, sehingga secara keseluruhan bentuk tubuhnya membesar pada bagian perut. Alat kelamin betina terletak pada pangkal pasangan kaki jalan ketiga, merupakan suatu lubang yang disebut "thelicum". Jarak antara pasangan kaki jalan kiri dan kanan setiap pasangan terlihat lebih lebar yang memungkinkan telur dapat berjalan ke arah perut (Soetarno, 1992).



Gambar 2. Udang Galah jantan dan Udang galah betina (Hadie dan Hadie,2002).

II.3 Migrasi *Macrobrachium rosenbergii*

Migrasi merupakan salah satu faktor yang dapat menyebabkan keragaman dalam suatu populasi. Migrasi yang tinggi antara satu populasi dengan populasi yang lainnya memungkinkan terjadinya perkawinan acak yang besar sehingga menyebabkan tingginya peluang heterozigositas dalam suatu populasi.

Menurut Soetomo (1990), migrasi udang adalah proses perpindahan sekelompok udang dari habitat satu ke habitat lain. Proses ini diduga terjadi karena

terbatasnya persediaan makanan dari suatu tempat sehingga mereka mencari tempat lain yang masih memiliki persediaan makanan yang cukup. Proses migrasi ini biasanya tertentu untuk setiap daerah dan kadang-kadang terjadi pada setiap pergantian musim. Migrasi juga terjadi apabila udang betina akan mulai bertelur sedangkan udang muda bermigrasi dari daerah muara sungai pada waktu larva dan menuju ke laut lepas untuk tumbuh menjadi dewasa.

II. 4 Siklus Hidup udang galah (*M. rosenbergii*)

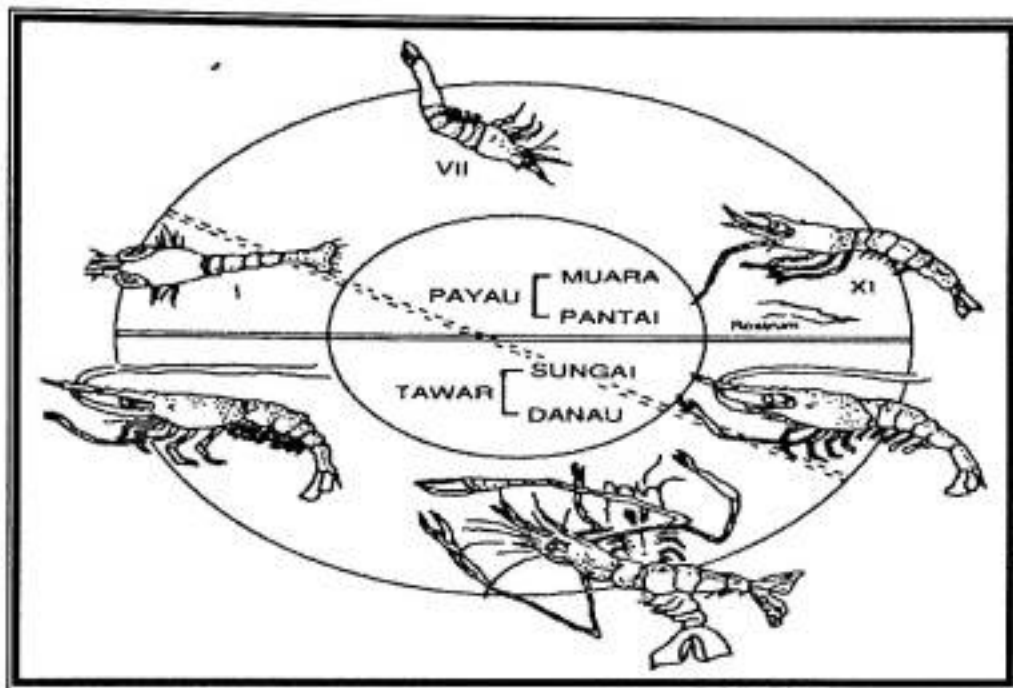
Dalam kehidupannya udang galah menempati dua habitat. Pada saat dewasa kelamin dan menetas menjadi plankton sampai larva stadium II, udang galah senang hidup di air payau. Tetapi setelah menjadi juvenile sampai usia dewasa, udang galah lebih senang hidup dalam air tawar. Setelah dewasa dan matang kelamin, udang galah kembali lagi ke air payau. Hal ini berkaitan dengan telur hasil perkawinan setelah menetas hanya dapat hidup di lingkungan air payau (Murtidjo, 2002) (Gambar 3).

Udang galah dewasa yang hidup di alam bebas dapat memijahkan telurnya dalam air tawar yang jaraknya puluhan kilometer dari laut, selanjutnya larva tersebut terbawa arus sungai menuju ke muara yang langsung berhubungan dengan laut. Di muara sungai yang kondisi airnya payau itulah larva udang melakukan metamorfose sampai menjadi juvenile (Murtidjo, 2002).

Udang yang telah dewasa dan matang kelamin, mulai beruaya menuju ke muara sungai yang air payau (salinitas 8 – 22 permil). Pencarian air payau karena



larva yang baru menetas membutuhkan air payau untuk hidupnya (Bardach dkk, 1972 dalam Baso 2001).



Gambar 3. Siklus hidup udang galah dan habitatnya (Hadie dan Hadie 2003)

Daur hidup udang galah dimulai dari telur-telur yang sudah dibuahi dan dierami oleh induknya selama 19-21 hari dan menetas menjadi larva (Ling 1969 dalam Hadie dan Hadie 2003). Larva yang baru menetas memerlukan air payau sebagai tempat kehidupannya. Jika larva tidak berada di lingkungan air payau selama 3-5 hari semenjak menetas, maka larva tersebut akan mati, namun jika larva yang baru menetas mendapat lingkungan hidup yang cocok maka larva akan dapat tumbuh menjadi pasca larva (benih/juvenil) (Ling dan Merican 1961 dalam Hadie 2003). Larva akan melewati 11 tahap perkembangan (11 stadium) untuk dapat menjadi pasca larva (benih/juvenile) hingga mencapai post larva. Pada setiap tahap terjadi pergantian kulit yang diikuti dengan perubahan struktur morfologis. Perbedaan kedua

habitat menyebabkan adanya perbedaan tingkah laku dan jenis makanannya (Hadie dan Hadie 2003).

Selanjutnya diterangkan bahwa di alam udang galah dapat berpijah di daerah air tawar pada jarak lebih dari 100 km dari muara dan membiarkan larvanya ikut terbawa aliran sungai dengan resiko kematian yang tinggi. Secara alami penyebaran udang galah meliputi daratan Indofasifik mulai dari bagian timur Benua Asia termasuk Indonesia. Di Indonesia sendiri udang galah tersebar luas mulai dari Sumatera, Jawa, Kalimantan sampai Irian. Keterlibatan manusia dalam penyebaran ini telah terlihat dengan diketemukannya udang galah di benua Amerika dan Australia. Sebelumnya di daerah tersebut tidak terdapat udang galah alami. Walaupun demikian tidak tertutup kemungkinan adanya cara penyebaran lain selain campur tangan manusia.

II.5 Penentu Keragaman Genetik (Sofro, 1994)

Keragaman genetik merupakan bahan baku bagi program pemuliaan mengingat besarnya keragaman dapat meningkatkan kemampuan beradaptasi suatu populasi jasad hidup terhadap perubahan lingkungan (Iranawati, 2002). Beberapa faktor yang menjadi penentu keragaman genetik dalam suatu populasi adalah (Sofro, 1994):

a. Sistem Perkawinan (*Mating*)

Perkawinan merupakan aktivitas organisme yang berketurunan secara seksual. Dengan cara ini suatu organisme mempertahankan keberadaannya. Ciri-ciri

genetis yang ada pada suatu generasi dengan sendirinya akan dapat diamati pula pada generasi keturunannya.

Pada pertemuan antara dua individu suatu organisme yang bereproduksi secara seksual, dua perangkat ciri genetis pada masing-masing genom akan bersatu membentuk satu perangkat ciri-ciri genetis baru. Dalam kaitan ini, pola pertemuan kedua genom ikut menentukan pola sebaran ciri-ciri genetis pada generasi baru. Seperti diketahui tidak semua populasi organisme melakukan aktivitas berkelamin atau perkawinan secara acak.

Selain perkawinan secara acak, dikenal juga adanya aktivitas perkawinan sekerabat (*inbreeding*). Pada keadaan semacam ini akan terjadi kenaikan frekuensi homosigositas. Populasi berkerabat dekat yang menempati suatu daerah cenderung mendorong terjadinya perkawinan sekerabat. Ini dapat terjadi misalnya pada populasi organisme yang dipisahkan secara geografis oleh laut yang luas atau pegunungan yang sulit dilewati. Populasi semacam ini tidak melihat adanya alternatif perkawinan selain perkawinan diantara mereka sendiri, dengan ciri-ciri genetis yang memiliki banyak persamaan karena anggota populasi ini paling tidak memiliki satu moyang. Pada setiap anggota populasi yang berasal dari satu moyang ini, gena atau alel yang dimiliki mungkin berasal dari molekul DNA yang identik. Pertemuan dua alel yang berasal dari satu moyang menambah peluang ekstra untuk homosigositas karena turunan.

b. Mutasi

Dalam pengertian luas, mutasi adalah munculnya jenis sifat pewarisan baru pada makhluk hidup. Pada hakekatnya mutasi merupakan asal-mula semua keanekaragaman genetik. Dengan adanya mutasi timbul keragaman genetik yang seterusnya akan terjadi proses mikroevolusi. Sebagai suatu proses, mutasi terjadi secara acak dan jarang sehingga sukar dicatat. Munculnya suatu alel baru akibat mutasi akan menyebabkan perubahan frekuensi gen-gen yang telah ada sebelumnya. Namun demikian perubahan frekuensi gen akibat proses mutasi adalah sangat lambat.

c. Arus gen

Arus gen menunjukkan adanya penyusupan gen dari satu populasi ke populasi lain. Meskipun dimungkinkan adanya saling tukar gen antara dua populasi, tetapi umumnya penyusupan gen berjalan satu arah. Karena pertukaran gen ini berlangsung sangat lambat, dua populasi yang semula berlainan akan tetap berlainan. Paling tidak diperlukan waktu yang sangat lama agar perbedaan genetik antara dua kelompok populasi tadi menghilang.

II.6 Isolasi DNA

DNA merupakan bagian terbesar dari nukleus yang mengandung unit-unit yang disebut sebagai nukleotida dimana tiap nukleotida mengandung gula deoksiribosa, asam posfat dan suatu basa yang mengandung nitrogen yang dapat mengendalikan perkembangan sifat biokimia, anatomis, fisiologis dan bertindak sebagai pembawa informasi genetik pada semua organisme (Campbell *et al.*, 2000;



Stansfield, 1991). DNA sebagai pembawa informasi genetik tersebut terdapat pada semua makhluk hidup, terdapat dalam sel, khususnya dalam inti sel (Muladno, 2002).

DNA dapat diperoleh dari suatu makhluk hidup dengan suatu proses ekstraksi DNA di dalam sel sehingga memudahkan dalam mengidentifikasi DNA yang disebut isolasi DNA (Sclief, 1986).

Dalam preparasi sampel untuk DNA merupakan langkah awal untuk menentukan keberhasilan proses identifikasi DNA dari sampel yang akan dilihat. Isolasi DNA dari sel membutuhkan perangkat, terutama laboratorium yang memenuhi syarat yang sangat dibutuhkan untuk melakukan proses isolasi DNA. Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada spesimen yang akan diekstraksi. Keberhasilan isolasi DNA sangat bergantung pada keterampilan teknik mengisolasi DNA yang akan diperiksa (Hatta, 2002), tujuan isolasi DNA adalah untuk mendapatkan sel tanpa debris sel (Toha, 2001). Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada spesimen yang akan dideteksi. Metode tersebut pada dasarnya memiliki prinsip yang sama, namun ada beberapa hal tertentu yang biasanya digunakan modifikasi untuk dapat menghancurkan inhibitor yang ada dalam masing-masing sumber spesimen (Steen, 1999; Hatta, 2002).

Teknik untuk isolasi DNA dapat dilakukan dengan dua cara yaitu; 1) metode fisik, yaitu sel di rusak secara mekanis atau dengan membuat sel menjadi shock, salah satu metode fisik adalah tehnik pemanasan dan pembekuan (Hatta, 2002). Pada teknik pemanasan dan pembekuan, sel dilisis dengan pemberian suhu tinggi dan selanjutnya didinginkan secara tiba-tiba dalam freezer sehingga sel mengalami shock, sel dapat



didenaturasi pada suhu 90 – 94°C (Artama, 1991), 2) metode kimia yaitu sel dilisis dengan menggunakan suatu zat kimia, sehingga mengganggu integrasi sel barier (Hatta, 2002).

Penghancuran sel yang dilakukan dengan menggunakan senyawa kimia seperti buffer TES yang terdiri atas Tris, EDTA (Etilendiamin Tetraacetat) dan SDS (Sodium Deodesil Sulfat). Dalam hal ini EDTA berfungsi sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat. Adapun SDS yang merupakan sejenis detergen yang bersifat basa kuat yang dapat digunakan untuk merusak membran sel. Hal ini mengakibatkan sel mengalami lisis. Kotoran atau debris sel yang ditimbulkan akibat pengrusakan sel oleh EDTA dan SDS dibersihkan dengan cara sentrifugasi, sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA). Untuk menghilangkan protein dari larutan digunakan fenol kloroform dimana fenol berfungsi mengikat protein dan sebagian kecil RNA sedangkan kloroform berfungsi untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan. Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase. Agar molekul RNA juga dibersihkan dari larutan, enzim RNase juga digunakan untuk merusak molekul tersebut, dengan hilangnya protein dan RNA maka DNA dapat diisolasi secara utuh. Hal ini dilakukan dengan cara memurnikan DNA dengan etanol 70% serta ditambahkan NH_4 asetat yang berfungsi untuk memekatkan DNA. Penambahan isopropanol akan menyebabkan DNA mengendap berupa tepung

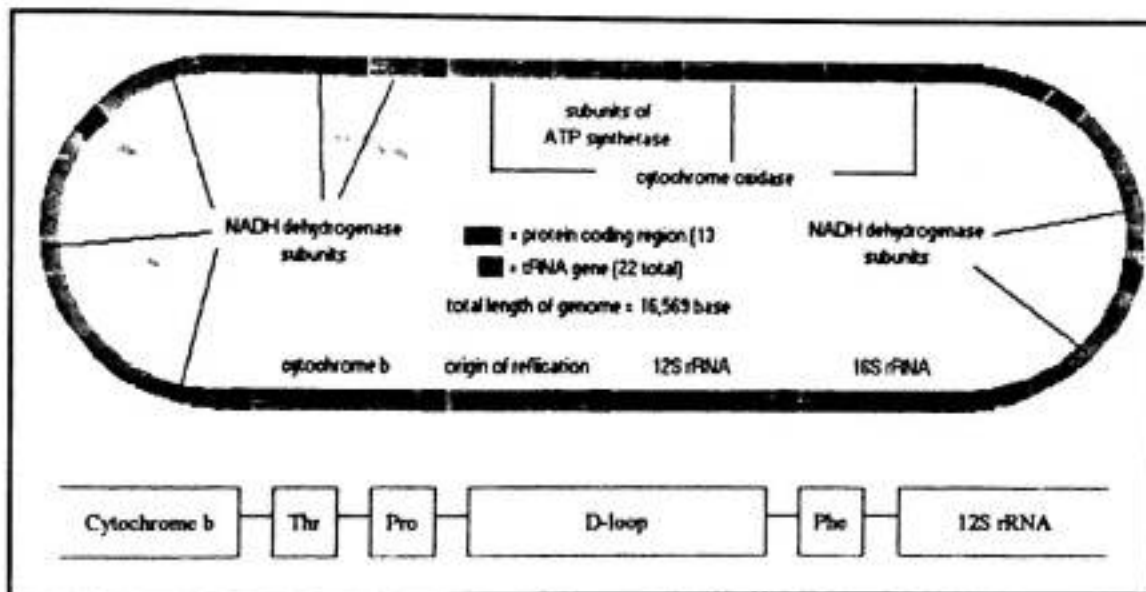
berwarna putih, endapan DNA tersebut dimurnikan kembali sebelum kemudian dilarutkan dengan penambahan buffer TE (Muladno, 2002).

II.7 Struktur DNA Mitokondria (mtDNA)

Dalam bidang perikanan, teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) telah berhasil diterapkan pada mitokondrial DNA (mtDNA) untuk mengidentifikasi keragaman genetik (Moritz *et al.*, 1987). Penggunaan mitokondrial DNA (mtDNA) di dalam teknik RFLP menurut Adams dkk (1992) dalam Triastuti (2003) lebih sensitif dibandingkan dengan allozym untuk menerangkan struktur populasi karena mtDNA bersifat haploid dan diturunkan dari induk betina saja. Selain itu sampel yang dibutuhkan dapat dalam bentuk segar, beku, ataupun jaringan atau sirip yang disimpan dalam alkohol. Teknik mtDNA juga bermanfaat untuk mempelajari tentang silsilah keturunan.

Sekuens mtDNA terdiri dari daerah *coding* dan *noncoding* (*control Region*= CR). Pada mamalia daerah *coding* terdiri dari 37 gen, yaitu 2 gen yang mengkode RNA ribosom (rRNA), 22 gen yang mengkode RNA *transfer* (tRNA) dan 13 gen yang mengkode polipeptida (protein). Gen tRNA tersebar di antara gen protein dan gen rRNA, sedangkan daerah kontrol terdiri dari daerah *noncoding major* dan *noncoding minor*. Daerah *noncoding major* merupakan sekuens dimana terdapat titik awal replikasi utas berat (*H-strand*) dan titik awal transkripsi sedangkan daerah *noncoding minor* merupakan sekuens dimana terdapat titik awal replikasi utas ringan (*L-strand*) (Gardner *et al.* 1984; Horai, 1991).

Pada banyak vertebrata, daerah kontrol terletak antara tRNA^{Pro} dan tRNA^{Phe}. Daerah kontrol genom mitokondria juga disebut *displacement loop* (D-loop). Disebut D-loop karena adanya utas tambahan yang membentuk *loop* pada awal replikasi dan disebut daerah kontrol karena di dalamnya banyak ditemukan motif runutan nukleotida yang mengatur fungsi replikasi dan translasi genom mitokondria hewan (Boore, 1999 dalam Irmawati, 2003).



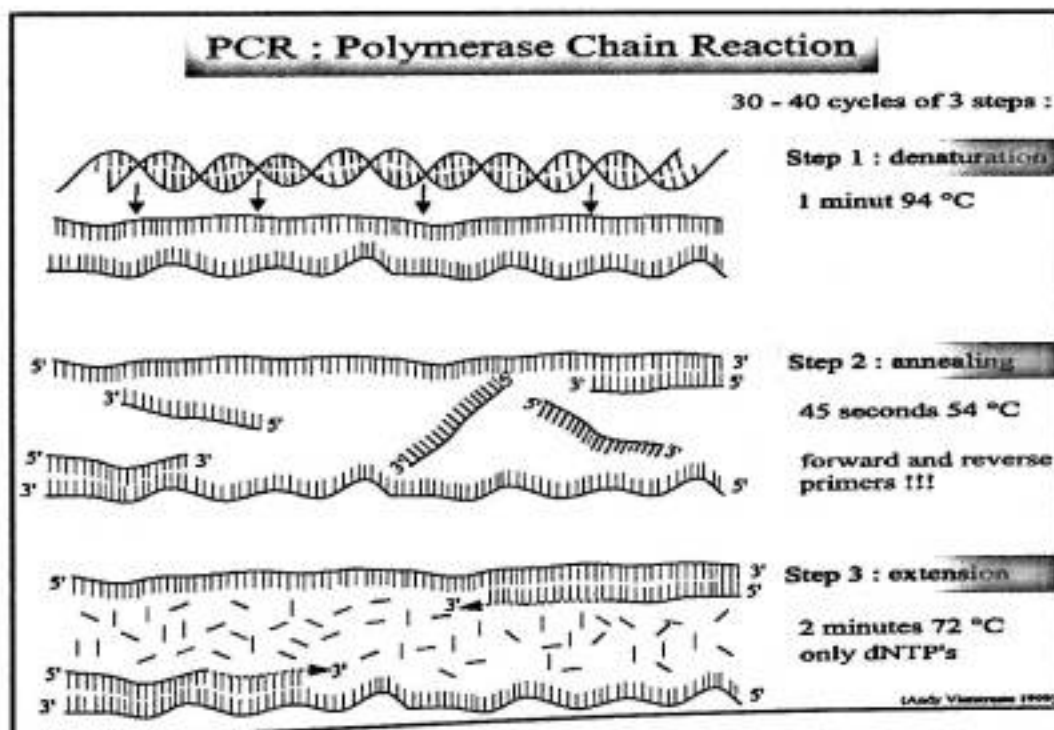
Gambar 4. Struktur DNA mitokondria (mtDNA) (Alberts *et al.*, 1989)

Analisis pada daerah D-loop sering digunakan untuk melihat keragaman antar sub-spesies maupun antar populasi. Daerah D-loop inilah yang diketahui memiliki perkembangan yang amat cepat dibandingkan dengan sekuens mtDNA lainnya. Juga memiliki laju akumulasi substitusi basa, laju insersi dan delesi yang lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti (Kitamura *et al.*, 1996).



II.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara invitro. Teknik ini ditemukan oleh Kary B. Mullis dan F. Faloona pada tahun 1985. PCR didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua untai DNA target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer (primer PCR) untuk memungkinkan DNA template dicopy oleh DNA polymerase (Nasir, 2002). PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template ($94 - 95^{\circ}\text{C}$), annealing (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target ($50 - 60^{\circ}\text{C}$) dan pemanjangan (72°C) (Retnoningrum, 2001).



Gambar 5. Tahapan PCR (Vierstraete, 1999)

Tiga tahapan penting dalam Proses PCR menurut Muladno (2002) :

a. Denaturasi

Di dalam proses PCR, denaturasi awal dilakukan sebelum enzim taq polimerase ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C.

b. Annealing (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR.

Waktu annealing yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50 – 60°C.

c. Pemanjangan Primer (Extention)

Selama tahap ini Taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

Apabila ketiga tahap dalam proses PCR telah dilakukan maka setiap satu segmen DNA pita ganda diamplifikasikan menjadi dua segmen DNA pita ganda yang identik, sehingga jumlahnya menjadi dua kali lebih banyak dari jumlah semula. Siklus diulang kembali, mulai lagi dengan denaturasi, penempelan dan ekstensi primer (Mordechai, 1999).

Komponen-komponen penting yang diperlukan dalam PCR adalah template (cetakan) untai ganda yang mengandung DNA yang akan diamplifikasi, enzim DNA Taq polymerase, keempat macam dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dan dGTP), buffer DNA polymerase, $MgCl_2$ dan sepasang primer oligonukleotida yang mengenali daerah awal dan akhir target DNA (Muladno, 2002).

Keunggulan PCR dikatakan sangat tinggi. Hal ini didasarkan atas spesifitas, efisiensi dan keakuratannya. Spesifitas PCR terletak pada kemampuannya mengamplifikasi sehingga menghasilkan produk melalui sejumlah siklus. Keakuratan

yang tinggi karena DNA polymerase mampu menghindari kesalahan pada amplifikasi produk. Masalah yang berkenaan dengan PCR yaitu biaya PCR yang masih tergolong tinggi (Mordechai, 1999).

II.9 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) merupakan metode yang dapat digunakan untuk menganalisa keragaman genetik spesies dalam satu populasi secara molekuler.

Teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki beberapa keunggulan yang lebih dibandingkan dengan isozym sebagai penanda molekuler karena jumlah dari penanda RFLP efektifitasnya tidak terbatas (Kuswinanti, 2001) serta memiliki tingkat akurasi yang paling tinggi (Ngili, 2003).

Teknik analisa *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memiliki spesifitas sampai tingkat interspesies karena adanya mutasi pada daerah *non-coding* DNA yang terjadi secara acak sehingga menyebabkan perbedaan tempat pemotongan oleh enzim restriksi tertentu. Panjang fragment DNA yang berbeda tersebut dapat dipisahkan melalui elektroforesis gel agarosa. Perbedaan pola pemotongan DNA atau polimorfisme tersebut akan diwariskan turunan generasi berikutnya (Primarck *dkk*, 1998). Dalam metode ini kita menggunakan elektroforesis gel untuk memilih berdasarkan ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari perlakuan molekul DNA yang panjang dengan suatu enzim restriksi. Dengan melihat pola pita yang berwarna pada gel akan didapatkan informasi yang bermanfaat secara ilmiah. Ketika campuran fragmen restriksi dari molekul DNA tertentu mengalami

elektroforesis, campuran itu akan menghasilkan pola pita yang khas, yang menunjukkan molekul awal dan enzim restriksi yang digunakan (Campbell *et al.*, 2000)

Dijelaskan juga bahwa selain dapat memunculkan fragmen-fragmen yang panjangnya berbeda elektroforesis gel dapat memisahkan konfigurasi molekul yang berbeda-beda dari suatu molekul DNA. Molekul DNA yang berbentuk lingkaran kovalen, lingkaran longgar (relaks) dan berbentuk lurus memiliki kecepatan gerak yang berbeda-beda (Old dan Primrose, 1989).

Teknik RFLP menggunakan suatu enzim restriksi atau endonuklease yaitu suatu enzim yang dapat memecahkan ikatan fosfodiester pada asam nukleat. Penggunaan fragmen restriksi sebagai marker genetik telah didemonstrasikan sejak tahun 1974 oleh Grodziker *et al.*, (1974). Enzim-enzim restriksi tersebut dapat memotong DNA pada tempat yang spesifik. Enzim restriksi yang berbeda akan menghasilkan potongan DNA yang berbeda (Watson dkk, 1998).

Analisis RFLP yang merupakan marker ko-dominan telah banyak digunakan untuk mencapai berbagai tujuan. Mengingat situs restriksi mempunyai sekuensi DNA tertentu, berarti variasi keberadaan situs restriksi mencerminkan adanya variasi sekuensi DNA (Sianipar, 2003).



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September-Desember 2005 berlangsung di Laboratorium Genetika Molekuler Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Sempur-Bogor.

III.2 Tempat pengambilan sampel

Pengambilan sampel udang galah dilakukan di Sungai Je'neberang (Makassar), Sungai Cenranae (Bone), Sungai Dongi (Bulukumba) dan Sungai Cerekang (Malili). Digunakan sampel sebanyak 10 ekor untuk tiap daerah.

III.3 Alat

III.3.1 Ekstraksi dan Isolasi Genom Total

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah; pinset, gunting, waterbath, tabung eppendorf 1,5 ml, rak tabung eppendorf, *flush sentrifuge*, vortex, freezer, gelas kimia, mikropipet.

III.3.2 PCR

Alat-alat untuk PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah freezer, mesin PCR, *PCR tube* (tabung PCR), rak tabung PCR, mikropipet.

III.3.3 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Retriksi

Alat-alat yang digunakan dalam analisis dengan metode RFLP adalah tabung PCR, rak tabung PCR, mikropipet, vortex dan waterbath.

III.3.4 Elektroforesis Gel Agarosa

Plate, sisir, *electrophoresis chamber*, *hot plate*, gelas kimia, erlenmeyer, sendok timbangan, stirer magnetik, mikropipet, neraca analitik, power supply, freezer, UV transiluminator, parafilm, kamera dan film polaroid.

III.4 Bahan

III.4.1 Ekstraksi dan Isolasi Genom Total

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi tersebut adalah 5-10 gram sampel kaki renang udang, aquadest, TNES Urea, Proteinase Kinase, Phenol Chloroform Isoamylalcohol (PCI), sodium asetat, alkohol 100%, TE buffer (10 mM Tris-Cl + 1 mM EDTA).

III.4.2 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Restriksi

Bahan-bahan yang digunakan adalah *template* mtDNA dari hasil amplifikasi PCR, Buffer enzim spesifik, enzim restriksi endonuklease (*Taq* I, *Hae* III, *Alu* I), *Loading dye* dan *aquadest*.

III.4.3 Elektroforesis Gel Agarosa

Bahan-bahan yang digunakan adalah gel agarosa 2%, aquabidest, Ethidium Bromida, buffer TBE 1x (0,50 M Tris, 0,65 M Borat, 0,02 M EDTA), *single band* genom mtDNA, *loading dye*, parafilm, aluminium foil, marker DNA.

III.5 Cara kerja

III.5.1 Kriteria sampel

Pengambilan sampel dilakukan di empat lokasi yaitu Sungai Je'neberang, Makassar, Sungai Dongi Kab. Bulukumba, Sungai Cenranae Kab. Bone dan Sungai



Cerekang Kab. Luwu Utara. Sampel yang digunakan sebanyak 10 ekor udang dengan berat antara 50-75 gram untuk masing-masing daerah. Selanjutnya sampel udang yang diperoleh dari masing-masing lokasi dibersihkan. Diusahakan agar kesegaran sampel tetap terjaga untuk kemudian diambil kaki renang. Bagian kaki renang tersebut diambil dengan menggunakan gunting dan pinset setelah itu dimasukkan ke dalam wadah yang telah diberi label dan berisi etanol absolut.

III.5.2 Ekstraksi dan isolasi genom total

Ekstraksi dan isolasi DNA total terdiri beberapa tahap yaitu tahap penghancuran sel, tahap eliminasi RNA, tahap pengendapan DNA dan tahap hidrasi DNA.

Tahap penghancuran sel dimulai dengan membersihkan sampel kaki renang dari larutan fiksatifnya dengan merendam sampel dalam tabung reaksi yang berisi akuades. Sebanyak 10-15 mg sampel dimasukkan ke dalam *ependorf* 1,5 ml, kemudian organ kaki renang dilisis dengan menambahkan 500 μ l *cell lysis solution* (larutan lisis sel) berupa TNES Urea. Setelah itu ditambahkan 10 μ l proteinase-K, divortex dan di *flush centrifuge*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-24 jam, dimana setiap jamnya divortex kembali selama 3-5 menit untuk mempercepat proses lisis sel.

Tahap eliminasi RNA dilakukan dengan menambahkan 500 μ l Phenol chloroform isoamylalkohol ke dalam sampel yang telah diinkubasi. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 15 menit.

Pengendapan DNA dimulai dengan memindahkan larutan supernatan yang mengandung DNA ke dalam *ependorf* baru, kemudian ditambahkan dengan 3M sodium asetat sebanyak 10 μ l dan 1000 μ l alkohol 100% dingin. Tabung kemudian dibolak-balik beberapa kali atau sampai terlihat adanya gumpalan putih berupa benang-benang DNA, kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 10000 rpm. Supernatan dibuang dan tabung yang berisi pellet DNA dikeringkan di atas kertas tissue. Setelah kering kemudian ditambahkan dengan 100 μ l TE buffer dan disimpan pada suhu 4°C.

Setelah itu kualitas DNA total yang diperoleh diuji dengan teknik elektroforesis gel agarose 2% dengan pewarnaan etidium bromida (EtBr).

Gel agarose dibuat dengan cara memasukkan 1,0 mg agarose ke dalam erlenmeyer 50 ml yang telah berisi 50 ml TBE 1x, setelah itu dipanaskan pada suhu 150°C dan diaduk dengan stirer magnetik sampai semua agarose cair kemudian ditambahkan dengan Ethidium bromida (EtBr). Selanjutnya dituang ke dalam cetakan dan sisir/*comb* dipasang untuk membentuk sumur/*well*. Gel yang telah beku dapat langsung digunakan untuk elektroforesis atau disimpan/*stock* dengan merendamnya dalam larutan TBE 1x.

III.5.3 Penggandaan Ruas D-loop mtDNA dengan PCR

Amplifikasi sekuen D-loop mitokondria dengan menggunakan primer universal yaitu primer *forward* 16s AR-L (5'- CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT - 3') dan primer *reversnya* 16s BR-H (5'- CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T -3'). Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode PCR dengan komposisi

bahan 2 μ l primer forward, 2 μ l primer reverse, 2 μ l DNA, dan 19 μ l air dengan total volume 25 μ l, yang dicampurkan dalam 1 unit *dry taq*. Sampel dimasukkan dalam mesin PCR dengan siklus; 1 siklus denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit, 35 siklus berikutnya terdiri atas denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, annealing pada suhu 45°C selama 1 menit dan extension pada suhu 72°C selama 2 menit 30 detik, extension akhir sebanyak 1 siklus pada suhu 72°C selama 10 menit. Proses terakhir adalah penstabilan suhu extension hingga mencapai suhu 4°C. Keberadaan hasil PCR di cek pada elektroforesis gel agarose 2% dan selanjutnya diamati di atas UV illuminator.

III.5.4 Pemotongan Produk PCR dengan Enzim Restriksi

Pemotongan mtDNA dengan enzim restriksi dilakukan dengan cara mencampur 2 μ l air, 5 μ l DNA *template*, 1 μ l buffer enzim spesifik, dan 2 μ l enzim restriksi dalam tabung PCR. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-24 jam. Setelah diinkubasi hasil pemotongan ditambah dengan 2 μ l *loading dye*. Jenis enzim restriksi yang digunakan sebanyak 7 enzim restriksi dengan situs pemotongan seperti Tabel 1.

Tabel 1. Jenis enzim restriksi yang digunakan untuk memotong mtDNA udang galah (*M. rosenbergii*)

| No. | Jenis Enzim | Sumber | Situs pemotongan |
|-----|-----------------|-------------------------------------|------------------|
| 1. | <i>Taq</i> I | <i>Thermus aquaticus</i> | T\CGA |
| 2. | <i>Hae</i> III | <i>Haemophilus aegyptius</i> | CG\CC |
| 3. | <i>Rsa</i> I | <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> | GT\AC |
| 4. | <i>Hind</i> III | <i>Haemophilus influenzae</i> | A\ACCTT |
| 5. | <i>Hin6</i> I | <i>Haemophilus influenzae</i> | G\CGC |
| 6. | <i>Nde</i> I | <i>Neisseria denitrificans</i> | CA\TATG |
| 7. | <i>Nde</i> II | <i>Neisseria denitrificans</i> | \GATC |

Hasil pemotongan dipisahkan melalui elektroforesis gel agarose 2% . Pada proses elektroforesis digunakan 10 μ l mtDNA hasil pemotongan ditambahkan 2 μ l loading dye. Marker yang digunakan adalah marker 100 bp yang dapat mendeteksi pasangan basa 100 hingga 10.002 bp dan mengandung 20 DNA fragmen (Sambrook *et al.* 1989) pada sumur yang mengapit sampel. Hasil elektroforesis restriksi mtDNA kemudian di amati di atas UV illuminator dan difoto dengan film polaroid .

III.6 Analisis data

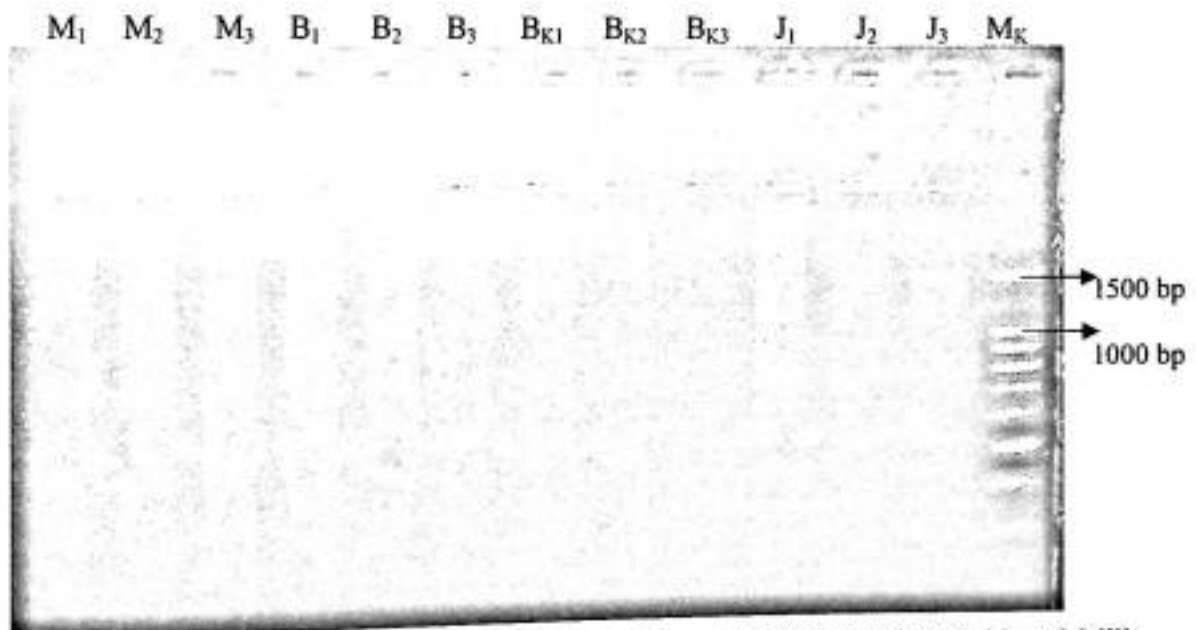
Analisis data dilakukan dengan mengamati secara visual dan deskriptif situs pemotongan yang didapatkan dari hasil restriksi enzim.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Ekstraksi DNA

Prosedur analisis DNA diawali dengan mengekstraksi genom DNA dari sumber sel. Lewin (1994) dalam Arifin (2005) menyatakan bahwa langkah awal dalam analisis DNA adalah memecahkan genom DNA menjadi fragmen-fragmen spesifik yang lebih kecil. Ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain di dalam suatu jaringan yang dilarutkan.



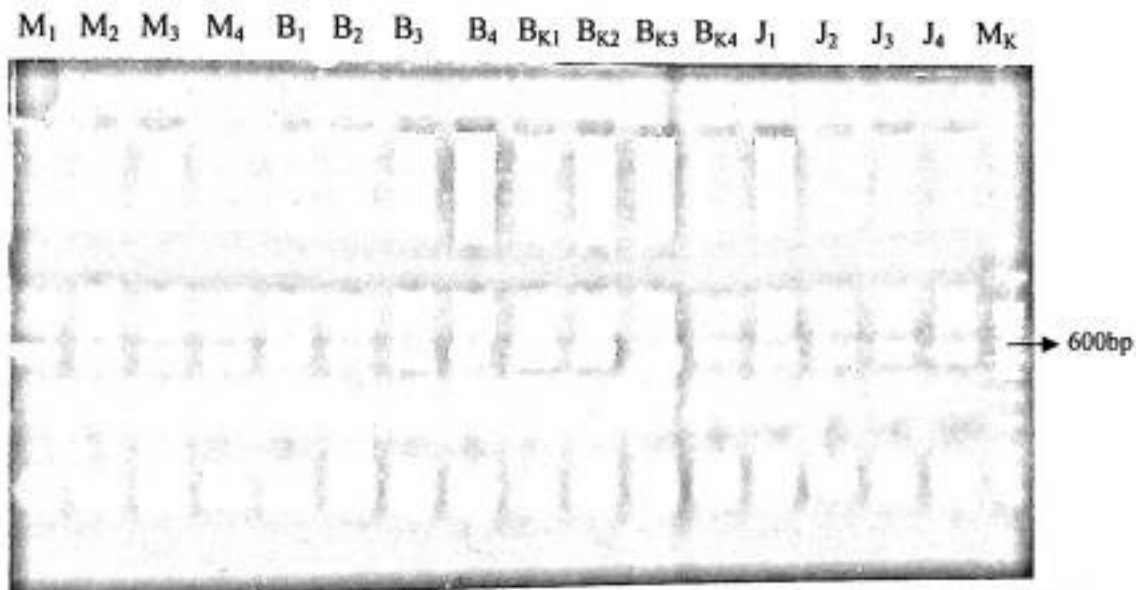
Gambar 6. Elektroforegram hasil ekstraksi DNA total udang galah (*M. rosenbergii*), M₁₋₃ : Malili, B₁₋₃ : Bone, BK₁₋₃ : Bulukumba, J₁₋₃ : Makassar, M_K : Marker 100 bp.

Pada proses ekstraksi DNA ini diperoleh hasil berupa pita DNA total dari udang galah (*M. rosenbergii*). Hasil ekstraksi DNA memperlihatkan pita DNA total dari sampel udang galah terletak di atas 1500 bp dari marker. Visualisasi pola pita

DNA dengan ketebalan yang hampir sama, menunjukkan bahwa konsentrasi DNA pada tiap sampel tidak jauh berbeda (gambar 5).

IV.2 Amplifikasi mtDNA

Hasil amplifikasi mtDNA menggunakan PCR dengan primer 16S AR-L (CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT) dan primer 16S BR-H (CCG GTT TGA ACT CAG ATC ATG T) menunjukkan bahwa mtDNA udang galah (*M. rosenbergii*) dari empat lokasi terletak pada 600 bp seperti terlihat pada gambar 6.



Gambar 7. Pola pita hasil amplifikasi mtDNA udang galah (*M. rosenbergii*), M₁₋₄ : Malili, B₁₋₄ : Bone, BK₁₋₄ : Bulukumba, J₁₋₄ : Makassar, Mk : Marker 100 bp.

Gambar 6 di atas menunjukkan bahwa kualitas mtDNA sampel cukup baik karena memberikan gambaran pita tunggal yang jelas. Hasil elektroforesis mtDNA setelah diamplifikasi memberikan gambaran pita tunggal (*single band*) pada 600 bp. Hal ini menunjukkan bahwa proses amplifikasi yang menggunakan primer 16S AR-L (CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT) dan primer 16S BR-H (CCG GTT TGA ACT

CAG ATC ATG T) dapat teramplifikasi dengan sempurna pada fragmen mtDNA yaitu pada 600 bp.

IV.3 Pemotongan dengan enzim restriksi

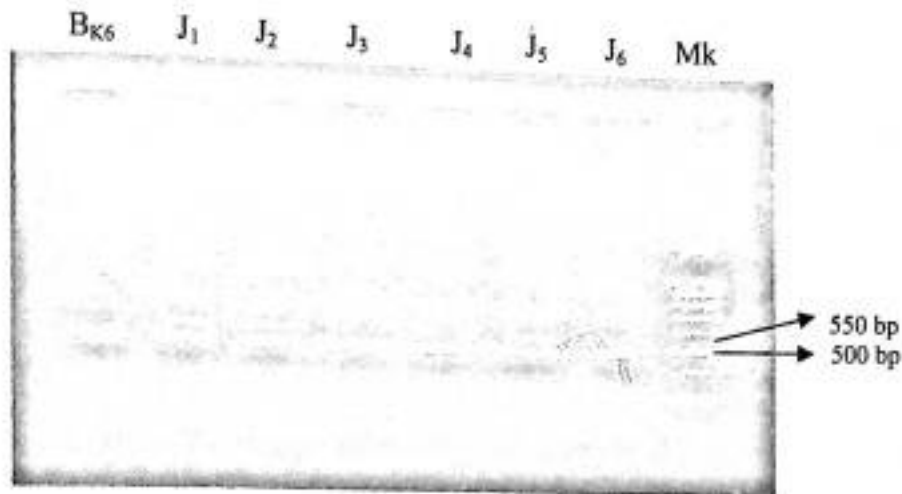
Pemotongan pita tunggal mtDNA sampel dengan menggunakan enzim restriksi bertujuan untuk mendapatkan beberapa potongan pada fragmen mtDNA yang telah teramplifikasi. Potongan-potongan fragmen mtDNA yang terbentuk akan digunakan untuk menganalisis variasi genetik dari sampel udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*).

Tabel 2. enzim restriksi dan situs pemotongan mtDNA udang galah (*M. rosenbergii*)

| No. | Jenis enzim | Pemotongan |
|-----|-----------------|------------|
| 1. | <i>Taq</i> I | + |
| 2 | <i>Nde</i> I | - |
| 3 | <i>Hind</i> III | - |
| 4 | <i>Hin6</i> I | - |
| 5 | <i>Rsa</i> I | + |
| 6 | <i>Nde</i> II | - |
| 7 | <i>Hae</i> III | + |

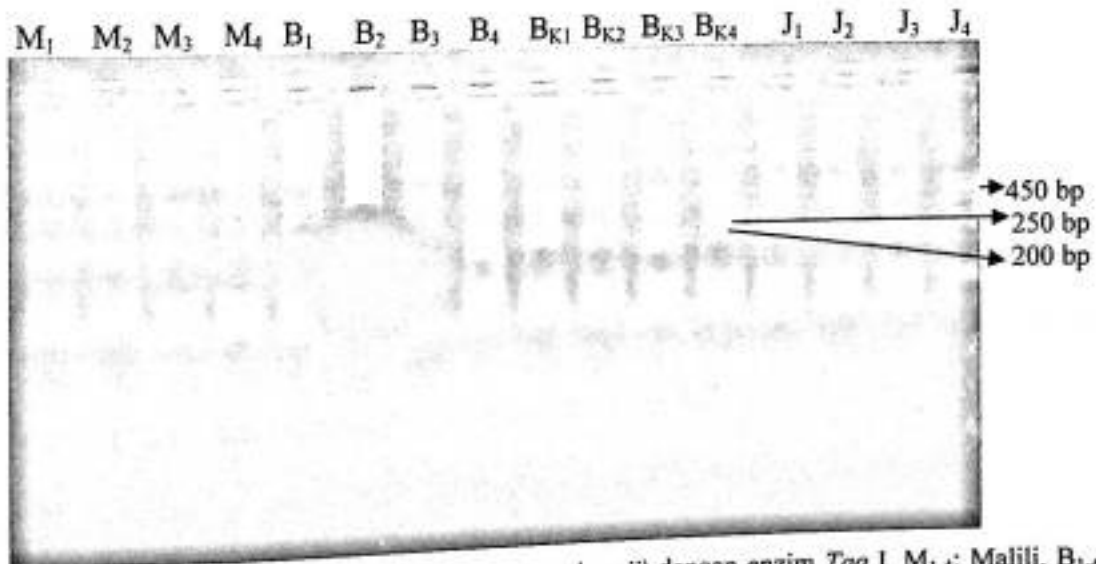
Keterangan : - : Tidak terpotong
+ : Terpotong

Dari tujuh enzim restriksi yang digunakan untuk pemotongan mtDNA sampel udang galah hanya tiga enzim yang mempunyai daerah pemotongan yaitu enzim *Taq* I, *Hae* III, dan *Rsa* I (Tabel 2).



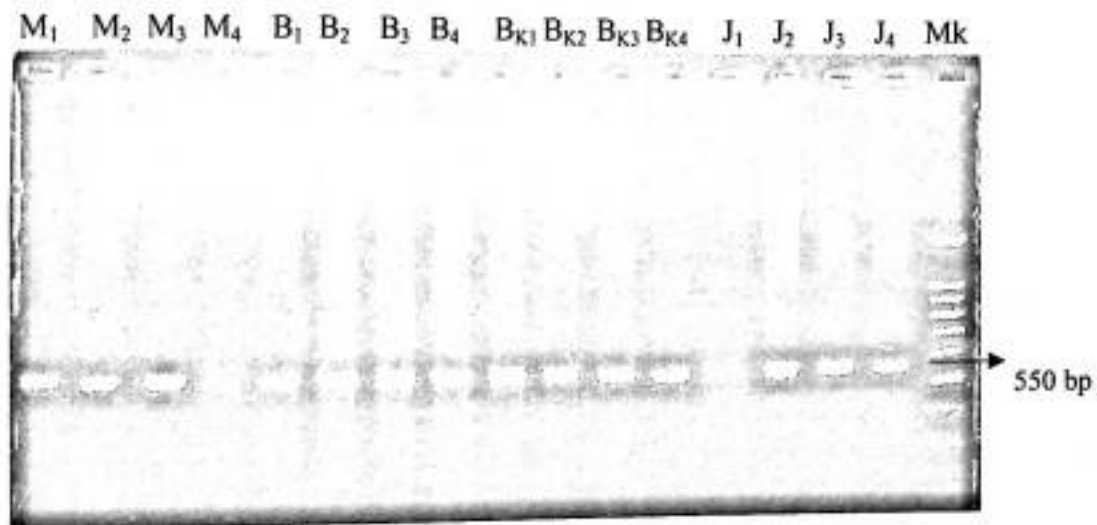
Gambar 8. Profil RFLP udang galah (*M. rosenbergii*) dengan enzim *Hae* III. BK₆; Bulukumba, J₅₋₆; Makassar, Mk; Marker 100 bp.

Pada gambar 8 di atas menunjukkan Enzim *Hae* III memotong pita tunggal pada 550 bp dan 500 bp untuk populasi Malili, Bone dan Makassar, sedangkan pada populasi Bulukumba selain memiliki pemotongan pada 550 bp dan 500 bp, terdapat beberapa sampel yang hanya memiliki pemotongan pada 500 bp saja.



Gambar 9. Profil RFLP udang galah (*M. rosenbergii*) dengan enzim *Taq* I. M₁₋₄; Malili, B₁₋₄; Bone, BK₁₋₄; Bulukumba, J₁₋₄; Makassar

Pemotongan mtDNA udang galah dengan menggunakan enzim *Taq* I menunjukkan profil yang sama untuk sampel udang galah yang berasal dari Malili, Bone dan Makassar, dimana enzim *Taq* I hanya memiliki satu daerah pemotongan yaitu pada 450 bp. Pada sampel udang galah asal Bulukumba, enzim *Taq* I menunjukkan profil yang polimorfik, selain memiliki pemotongan pada 450 bp, pada beberapa sampel enzim *Taq* I juga memotong pada 200 bp dan 250 bp (gambar 8).



Gambar 10. Profil RFLP udang galah (*M. rosenbergii*) dengan enzim *Rsa* I. M₁₋₄; Malili, B₁₋₄; Bone, B_{K1-4}; Bulukumba, J₁₋₄; Makassar, Mk; Marker 100 bp.

Gambar 9 di atas menunjukkan profil potongan DNA yang monomorfik atau seragam untuk semua sampel. Enzim *Rsa* I memotong pada satu daerah saja yaitu pada 550 bp untuk semua sampel yang diamati .

Tael 3. Hasil Pemotongan produk amplifikasi 600 bp dengan enzim restriksi

| Enzim Restriksi | Lokasi (Jumlah) | Daerah Pemotongan | | |
|-----------------|-----------------|-------------------|------------|------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| <i>Hae</i> III | Malili (5) | 500 bp (5) | 550 bp (5) | - |
| | Bone (5) | 500 bp (5) | 550 bp (5) | - |
| | Makassar (6) | 500 bp (6) | 550 bp (6) | - |
| | Bulukumba (6) | 500 bp (6) | 550 bp (5) | - |
| <i>Taq</i> I | Malili (5) | 450 bp (5) | - | - |
| | Bone (5) | 450 bp (5) | - | - |
| | Makassar (6) | 450 bp (6) | - | - |
| | Bulukumba (6) | 200 bp (4) | 250 bp (5) | 450 bp (5) |
| <i>Rsa</i> I | Malili (5) | 550 bp (5) | - | - |
| | Bone (5) | 550 bp (5) | - | - |
| | Makassar (6) | 550 bp (6) | - | - |
| | Bulukumba (6) | 550 bp (6) | - | - |

Tabel 3 di atas memperlihatkan bahwa pada enzim *Hae* III terjadi pemotongan pada 500 bp dan 550 bp untuk sampel yang berasal dari Malili, Bone Makassar dan Bulukumba namun ada beberapa sampel dari Bulukumba yang hanya memiliki potongan pada 500 bp saja. Pada enzim *Taq* I terjadi pemotongan hanya pada 450 bp untuk sampel yang berasal dari Malili, Bone dan Makassar, sedangkan sampel yang berasal dari Bulukumba pemotongan terjadi pada 450 bp, 250 bp dan 200 bp dan enzim *Rsa* I memiliki pemotongan pada 550 bp untuk semua sampel. Dari ketiga enzim restriksi tersebut terlihat bahwa enzim *Hae* III dan *Taq* I merupakan enzim yang memberikan gambaran polimorfik.

Pada tabel 3 di atas dapat dilihat bahwa hasil potongan enzim restriksi dalam satu populasi dan antar populasi memiliki jumlah dan titik potong yang

berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik pada sampel udang galah yang digunakan.

Dari proses restriksi dengan menggunakan enzim, terlihat bahwa untuk sampel udang galah asal Malili, Bone dan Makassar memiliki profil potongan pita DNA yang seragam. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel dari ketiga lokasi tersebut memiliki kesamaan genetik. Menurut Arifin (2005) adanya kesamaan ini memperbesar peluang indikasi adanya kesamaan sumber genetik. Hal ini diduga disebabkan oleh kegiatan persilangan untuk keperluan budidaya yang menggunakan ketiga populasi tersebut sebagai sumber induk.

Adanya kesamaan antara sampel udang galah dari daerah yang satu dengan daerah yang lain dipengaruhi oleh sifat dari udang galah yang telah matang kelamin akan bermigrasi menuju muara sungai, mereka mencari air payau untuk larva-larva mereka, larva udang galah bersifat plankton yang pergerakannya tergantung oleh arus. Pada saat larva itulah yang memungkinkan adanya percampuran udang galah dari daerah yang satu dengan daerah yang lain. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mudjiman, A (1991) bahwa, udang yang telah dewasa dan matang kelamin, mulai beruaya menuju muara sungai di daerah hilir, mereka mencari air payau (setenga asin, dengan kadar garam 5 – 20 permil), mereka mencari air payau karena larva udang galah sangat membutuhkan air payau untuk hidupnya, didalam air payau di muara sungai itu, larva udang galah hidup bebas melayang-layang dalam air, hidup demikian ini dikenal dengan istilah *planktonis*. Kemudian ditambahkan oleh Murtidjo (2002) menyatakan bahwa udang galah dewasa yang hidup di alam bebas dapat memijahkan

telurnya dalam air tawar yang jaraknya puluhan kilometer dari laut, selanjutnya larva tersebut terbawa arus sungai menuju ke muara yang langsung berhubungan dengan laut. Di muara sungai yang kondisi airnya payau itulah larva udang melakukan metamorfose sampai menjadi juvenile.

Selain itu adanya campur tangan manusia juga sangat berpengaruh terhadap percampuran antara kelompok udang galah ini, dimana pada daerah Gowa dan Bone sudah dilakukan budidaya untuk udang galah ini, sehingga memungkinkan nelayan untuk mengambil induk dari daerah lain.

Adanya kesamaan sumber genetik antara sampel udang galah yang berasal dari ketiga populasi tersebut kemungkinan disebabkan juga oleh terjadinya migrasi reproduksi atau pertukaran gen antara ketiga populasi tersebut akibat perkawinan, mengingat sungai Cenranae (Bone) dan sungai Cerekang (Malili) bermuara pada lokasi yang sama yaitu Teluk Bone. Meskipun sungai Je'neberang (Makassar) bermuara pada lokasi yang berbeda yaitu Selat Makassar, kesamaan genetik tersebut kemungkinan besar disebabkan oleh adanya kegiatan *restocking* di sungai Je'neberang, dimana sumber induk untuk kegiatan ini didatangkan dari Malili dan Bone (Loka Takalar).

Berdasarkan pada pola pemotongan oleh enzim restriksi yang digunakan, terlihat bahwa sampel udang galah asal Bulukumba memiliki variasi pola pemotongan pita DNA yang paling beragam (polimorfik) dibandingkan dengan sampel lain yang diamati, hal ini mengindikasikan bahwa sampel udang galah asal

Bulukumba memiliki variasi genetik yang paling tinggi dibandingkan dengan sampel lainnya yang diamati.

Tingginya variasi genetik pada sampel udang galah ini kemungkinan disebabkan oleh populasi yang masih alami dan belum banyak kegiatan eksploitasi sehingga peluang terjadi perkawinan acak di alam tinggi, dimana berdasarkan informasi dari Loka Takalar, Bulukumba belum banyak dijadikan sebagai sumber induk untuk usaha budidaya.

Menurut Sugama (1988) variasi genetik suatu spesies merupakan sumber daya biologi primer dalam mendukung suksesnya manajemen populasi alam dan reproduksi buatan secara efisien. Hilang atau berkurangnya variasi genetik akan berakibat fatal dalam perkembangan, pertumbuhan, fertilitas serta daya tahan tubuh terhadap penyakit, yang merupakan proses penting dalam ketahanan hidup, produksi dan reproduksi (Soelistyowati, 1996).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil analisis dengan menggunakan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) maka dapat disimpulkan bahwa:

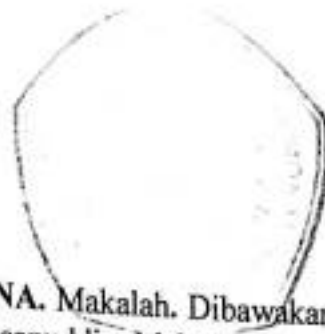
- Variasi genetik *Macrobrachium rosenbergii* De Man terdeteksi lebih baik dengan menggunakan enzim restriksi *Taq I* karena memberikan gambaran yang polimorfik dibandingkan dengan enzim lain yang digunakan.
- Sampel udang galah (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) dari Bulukumba memiliki variasi genetik yang paling tinggi dibandingkan dengan ketiga populasi lainnya yang diamati yaitu; Malili, Bone dan Makassar.

V.2 Saran

Perlu penambahan jumlah sampel dan enzim restriksi yang digunakan untuk mendapatkan informasi keragaman genetik udang galah (*M. rosenbergii*) yang lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD., 1989. **Molecular Biology of the cell 2nd ed.** Garland Publishing inc. New York and London.
- Anonim. 1980. **Program Udang Nasional Hasil Loka Karya Pembenuhan.** Dirjen Perikanan dan Badan Penelitian dan Pengembangan Penelitian. Jakarta.
- Anonim. 1994. **Ensiklopedia Nasional Indonesia Jilid 17.** PT Cipta Adi Pustaka. Jakarta.
- Anonim. 2005. **Aspek Pemasaran, Budidaya Pendederan dan Pembesaran Udang Galah.** Sistem Informasi Pengembangan Usaha Kecil Bank Indonesia.
- Arifin, O.Z., 2005. **Polimorfisme mtDNA Keturunan pertama (F1) Dalam Seleksi Famili Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Di BPBI Wanayasa Jawa Barat.** Sekolah Pasca Sarjana. IPB. Bogor.
- Artama, T.W., 1991. **Rekayasa Genetik.** PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Baso, L. 2001. **Pengaruh Warna Wadah Terhadap Pertumbuhan dan Sintasan Larva Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii de man*).** Skripsi. Jurusan Perikanan. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Campbell, N.A., B.R. Jane, G.M. Lawrence. 2000. **Biologi Jilid 1 Edisi Kelima.** Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Gardneret EJ., Simmons MJ., Snustad OP., 1984. **Principles of Genetics.** Jon Wiley and Sons Inc. New York
- Grodziker T. et al., 1974. **Physical Mpping of Temperature Sensitive mutation of Adenovirus.** Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 39: 439-446.
- Hadie, W. & Hadie L. E., 2002, **Budi Daya Udang Galah GIMacro di Kolam Irigasi, Sawah Tambak dan Tambak,** Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hadie, W. & Hadie, L. E., 2003. **Pembenuhan Udang Galah Usaha Industri Rumah Tangga.** Kanisius. Yogyakarta.



- Hatta, M., 2002. **Teknik Isolasi dan Pengukuran DNA**. Makalah. Dibawakan pada Seminar Teknik Isolasi DNA. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Horai S., 1991. **Mitochondrial DNA and Human evolution**. Progress in neuropatology 7: 9-17..
- Ipindhari, A., 1987. **Pengujian Bakteriologis Udang Windu (*Penaeus monodon Fabricius*) dari Beberapa Eksportir di Sulawesi Selatan**. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Iranawati, F., 2002. **Variasi Genetik Beberapa Udang Windu (*Penaeus monodon Fab.*) di Sulawesi Selatan melalui Analisa Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**. Thesis. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Irmawati. 2003. **Perubahan Keragaman Genetik Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Generasi Pertama Pada Stok Hatchery**. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kuswinanti, T., 2001. **Karakteristik Biomolekuler Cendawan *Phoma lingam* (Theleomorph *Leptosphaeria maculans*) Penyebab Penyakit Kaki Hitam Kubis-Kubisan (*Brassica spp.*)**. Jurnal Fitomedika Vol. 3. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Mordechai, E., 1999. **Application of PCR The methodologies in Molecular Diagnostic**. Burlington Country, USA.
- Moritz, C., Dowling TE., Brown WM., 1987. **Evolusi Of Animal mtDNA: Relevance for Population Biology and Systematic**. Ann. Rev. Ecol. Syst 18 : 269-292.
- Mudjiman, A., 1991. **Budidaya Udang Galah**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Muladno. 2002. **Seputar Teknologi Rekayasa Genetika**. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Murtidjo. B.A., 2002. **Budidaya Udang Galah dalam Monokultur**. Penerbit Kanisus. Yogyakarta.
- Nasir, M., 2002. **Bioteknologi Potensi Dan Keberhasilannya Dalam Bidang Pertanian**. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

- Ngili, Y., 2003. **Mengenal DNA Mitokondria dan Aplikasinya**. Laboratorium Rekayasa Genetika KPP Bioteknologi Institut Teknologi Bandung. Kompas.
- Old, R.W. dan S.B. Primrose. 1989. **Prinsip-Prinsip Manipulasi Gen Pengantar Rekayasa Genetik Edisi Keempat**. UIP.
- Primarck, R.B., J. Supriatna, M. Indrawan, & P. Karmadibrata. 1998. **Biologi Konservasi**. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Retnoningrum, S.D., 2001. **Prinsip Dasar PCR dan Amplifikasinya**. Bahan Kursus Biologi Molekuler. Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory manual 2nd**. Cold Spring harbor. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scleif, R., 1986. **Genetics and molecular biology**. Benjamin Publishing. Canada.
- Sianipar, N., 2003. **Penggunaan marker RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dalam pemuliaan Tanaman**. Makalah pribadi Pengantar Ke Falsafah Sains. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. [//A:/Falsafah%20Sains.htm](http://A:/Falsafah%20Sains.htm)
- Soetarno. 1992. **Budi Daya Udang**. Penerbit Aneka Ilmu. Semarang.
- Soetomo, M., 1990. **Teknik budi daya udang windu**. Penerbit Sinar Baru. Bandung.
- Soelistyowati, D.T., 1996. **Genetika Populasi**. Jurusan Budidaya Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sofro, A.S.M., 1994. **Keanekaragaman Genetik**. Penerbit Andi Offset. Yogyakarta
- Stansfield, W.D., 1991. **Genetika Edisi kedua**. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Steen, S.W., 1999. **Handbook for DNA Isolation, RAPD-PCR, and PCR-RFLP Botanical garden and Museum**. University of Oslo.
- Sugama, K., 1988. **Population Genetic Analysis of Red Sea Bream, *Pagrus mayor***, Thesis for The Degree of Master of Science. Kochi University. Japan.
- Sugama, K., Haryanti, .A.H. Benzie & E. Ballment. 2002. **Genetic Variation and Population Structur of The Giant Tiger Prawn *Penaeus monodon* in Indonesia**. Aquacultur. Elsevier 205.

Toha, A.H.A., 2001. **Deoxyribo Nucleac Acid, Ekspresi, Rekayasa, Keanekaragaman, Efek Pemanfaatannya.** Penerbit Alfabeta. Bandung.

Vierstraete, A., 1999. **Principle of The PCR.** Principle of PCR.htm.

Watson , J.D., J. Tooze & D.T. Kurtz., 1998. **DNA Recombinant : Suatu Pelajaran Singkat.** Penerbit Erlangga. Jakarta.