

VARIASI GENETIK HASIL PERSILANGAN NILA BEST DENGAN RED NIFI DAN NIRWANA MENGGUNAKAN PENANDA RAPD

Iskandariah, Irin Iriana Kusmini, Otong Zenal Arifin, dan Rudhy Gustiano

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar
Jl. Sempur No. 1, Bogor 16154
E-mail: *iskandariah74@yahoo.com*

(Naskah diterima: 16 Agustus 2011; Disetujui publikasi: 7 November 2011)

ABSTRAK

Penelitian mengenai variasi genetik dari hibridisasi 3 varian ikan nila (BEST, Red NIFI, dan Nirwana) telah dilakukan di Laboratorium Molekuler Biologi, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar (BRPBAT) Bogor. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik hasil hibridisasi antara nila BEST, Nirwana, dan Red NIFI dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Amplifikasi DNA menggunakan primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05. Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase polimorfisme berkisar antara 18,1818%–42,4242%, dengan nilai heterozigositas 0,0733–0,1564 dan jarak genetik antar populasi 0,3735–0,5300. Keragaman genetik tertinggi diperoleh pada hasil hibridisasi antara nila BEST dengan Nirwana. Nilai polimorfisme meningkat sebesar 10,6060% dan heterozigositas 0,0352 pada populasi hasil hibridisasi dibandingkan dengan populasi *true breeding*. Hal ini menunjukkan bahwa hibridisasi dapat meningkatkan nilai keragaman genetik dari suatu populasi ikan.

KATA KUNCI: RAPD, genetik, varian, ikan nila, *Oreochromis*

ABSTRACT : *Genetic variance of hybrids produced from three strains of tilapia (BEST, Red NIFI, and Nirwana) using RAPD. By: Iskandariah, Irin Iriana Kusmini, Otong Zenal Arifin, and Rudhy Gustiano*

Study on genetic variance of hybrids produced from three strains of tilapia (BEST, Red NIFI, and Nirwana) has been carried out at the Laboratory of Molecular Biology, the Research Institute for Freshwater Aquaculture (RIFA) Bogor. The purpose of this study was to determine the genetic diversity of hybrids produced from crossing among BEST, Nirwana, and RedNIFI tilapias by using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). DNA amplification used primers OPA-02, OPA-03, and OPC-05. The results showed that the percentage of polymorphism ranged from 18.1818%-42.4242%, with a heterozygosity value of 0.733-0.1564 and the genetic distance between populations was 0.3735-0.5300. The highest genetic diversity was found on hybrid between BEST and Nirwana tilapias. Polymorphism value increased by 10.6060% with heterozygosity of 0.0352 in hybrid populations compared with the true breeding populations. This suggests that hybridization can increase the value of genetic diversity of a fish population.

KEYWORDS: RAPD, genetic, variants, tilapia, *Oreochromis*

PENDAHULUAN

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) merupakan salah satu komoditas unggulan budidaya yang diharapkan dapat memenuhi target pemerintah dalam meningkatkan produksi perikanan nasional sebesar 353% pada tahun 2015. Ikan ini tahan terhadap penyakit, mudah berkembang biak dan toleran terhadap kualitas air yang rendah termasuk kadar oksigen terlarut yang rendah.

Penggunaan ikan nila sebagai komoditas budidaya yang semakin populer dan berkembang di masyarakat secara luas telah menyebabkan terjadinya penurunan kualitas genetik. Secara umum penurunan kualitas genetik ikan ditandai dengan pertumbuhan yang lambat, tingkat kematian tinggi, kematangan gonad pada usia dini, dan ukuran individu yang kecil. Rendahnya keragaman genetik akan mengakibatkan munculnya sifat-sifat negatif, antara lain menurunnya pertumbuhan, keragaman ukuran, kestabilan perkembangan organ, tingkat sintasan serta adaptasi terhadap perubahan lingkungannya (Leary *et al.*, 1985). Terjadinya penurunan kualitas genetik ini pada akhirnya akan menyebabkan menurunnya produksi maupun produktivitas para pembudidaya ikan, sehingga perlu adanya suatu upaya perbaikan mutu genetik ikan nila.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam meningkatkan mutu genetik ikan adalah dengan melakukan hibridisasi untuk mendapatkan sifat unggul yang lebih baik dari populasi asal. Pada dasarnya hibridisasi adalah memanfaatkan sifat heterosis karena sifat dominan dan heterozigot pada banyak lokus, atau interaksi alela pada lokus. Persilangan umumnya dilakukan antar populasi yang memiliki keunggulan spesifik (Gustiano *et al.*, 2008). Menurut Ariyanto (2003), persilangan dilakukan untuk mencegah terjadinya kemunduran genetik yang biasa terjadi akibat silang dalam (*inbreeding*).

Ikan nila BEST, Red NIFI, dan Nirwana merupakan strain unggul yang bisa dijadikan bahan dasar untuk hibridisasi pada ikan nila. Ikan nila BEST (*Bogor Enhanced Strain Tilapia*) merupakan ikan nila hasil pemuliaan dari generasi ke-6 nila GIFT melalui program seleksi famili yang dilakukan oleh Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor. Ikan nila BEST memiliki beberapa keunggulan, seperti: mampu menghasilkan telur dan benih yang lebih

banyak, larva ikan lebih besar dan mempunyai rata-rata pertumbuhan yang tinggi pada berbagai lingkungan budidaya. Ikan nila Nirwana merupakan hasil seleksi famili dengan bahan dasar ikan nila GIFT (*Genetic Improvement Farm Tilapia*) dan nila GET (*Genetically Enhanced Tilapia*) dari Philipina yang dilakukan Balai Pengembangan Benih Ikan (BPBI) Wanayasa, Purwakarta. Pertumbuhan bobot ikan nila Nirwana meningkat sekitar 45% pada generasi ke-3 (F3) dibandingkan dengan populasi awalnya (Gustiano & Arifin, 2010). Sedangkan Red NIFI merupakan jenis ikan nila merah yang didatangkan dari Thailand pada tahun 1989 (Gustiano *et al.*, 2008). Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor telah melakukan hibridisasi antara ketiga jenis ikan unggulan tersebut.

Untuk mengetahui sejauh mana hasil hibridisasi dapat meningkatkan mutu genetik dari suatu jenis ikan maka perlu dilakukan analisis DNA. Ada beberapa metode yang dapat dilakukan, salah satunya menggunakan teknik RAPD.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik hasil persilangan nila BEST dengan Nirwana dan Red NIFI dengan menggunakan metode RAPD.

BAHAN DAN METODE

Ikan Uji

Ikan uji yang digunakan adalah ikan hasil persilangan antara nila BEST dengan Nirwana dan Red NIFI dengan masing-masing populasi diambil 10 sampel. Sampel ikan nila yang digunakan berupa sirip yang dipotong dan disimpan dalam larutan alkohol 70% untuk digunakan dalam proses analisis.

Ekstraksi DNA

DNA ikan diekstraksi dari potongan sirip dengan menggunakan metode *Phenol-Chloroform* (Nugroho *et al.*, 1997). Potongan sirip sebanyak 5–10 mg dimasukkan dalam mikrotube 1,5 mL yang telah diisi dengan 500 mL TNES Urea, kemudian ditambah 10 µL Protein Kinase. Setelah *divortex* selama 1 menit sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambah larutan *Phenol Chloroform* sebanyak 1000 µL dan di *vortex* selama 1 menit. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan dalam

mikrotube baru, lalu ditambah dengan 1000 μL *ethanol* 90% dan 10 μL CH_3COONa . Sampel lalu *divortex* selama 1 menit sampai terlihat gumpalan berwarna putih. DNA diendapkan dengan cara mensentrifusinya dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, lalu cairannya dibuang dan dikeringkan pada suhu kamar. Pellet DNA dilarutkan dengan 100 μL Tris-EDTA (TE) *buffer* dan disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

Primer yang digunakan adalah OPA 01-20 dan OPC 01-20. Proses amplifikasi dilakukan dengan metode *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi reaksi: 1 μL DNA; 1,5 μL primer; 12,5 μL 2X PCR *Master Mix*; dan 10 μL H_2O ; dengan total volume 25 μL . Selanjutnya dimasukkan dalam *thermocycler* dengan 1 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, 35 siklus penggandaan yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 36°C selama 1 menit dan elongasi pada suhu 72°C selama 2,5 menit; dan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) *buffer* 1%. Hasilnya diamati dengan UV illuminator dan dicetak gambarnya dengan Polaroid.

Analisis Data

Nilai polimorfisme dan heterozigositas dianalisis dengan menggunakan *descriptive*

statistics (Miller, 1997). Analisis statistik menggunakan *exact test for population differentiation* (Raymond & Rousset, 1995 dalam Miller, 1997) dan kekerabatan antar populasi dianalisis dengan menggunakan jarak genetik menurut Wright (1978) modifikasi Rogers (1972) dalam Miller (1997).

HASIL DAN BAHASAN

Dari 20 jenis primer yang dicoba, 3 primer yakni: OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 dapat menghasilkan amplifikasi dalam jumlah sampel yang banyak. Hasil amplifikasi DNA dari ketiga primer menghasilkan jumlah fragmen antara 15-27 buah dengan ukuran berkisar antara 200-2000 bp (Tabel 1). Contoh hasil amplifikasi dari ketiga primer tersebut pada populasi hasil hibridisasi disajikan pada Gambar 1-3, sedangkan hasil amplifikasi pada populasi *true breeding* tersaji pada Gambar 4-6.

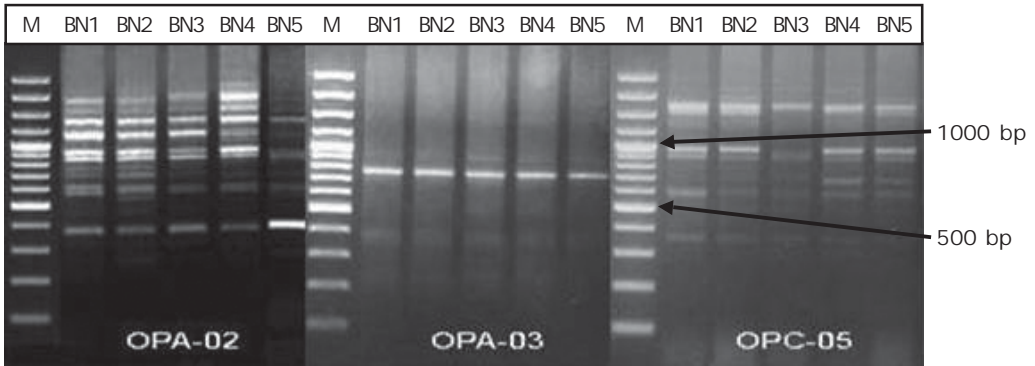
Persentase polimorfisme berkisar antara 12,1212%-42,4242% dan heterozigositas antara 0,0514 - 0,1564. Nilai polimorfisme dan heterozigositas tertinggi pada populasi hasil persilangan BEST X Nirwana dan terendah pada populasi *true breeding* Nirwana X Nirwana (Tabel 2).

Secara statistik dengan menggunakan uji perbandingan berpasangan *Fst* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan genetik secara nyata antar populasi ikan nila yang diuji ($P < 0,05$), kecuali antara populasi BEST X BEST dengan Red NIFI X Red NIFI (Tabel 3).

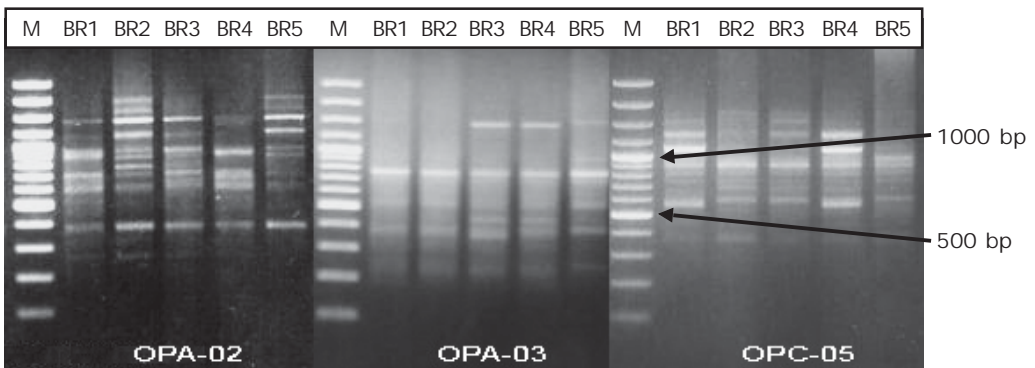
Tabel 1. Jumlah fragmen dan kisaran ukuran hasil amplifikasi DNA menggunakan primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05

Table 1. Number of fragments and size ranges of DNA amplification using the primers OPA-02, OPA-03, and OPC-05

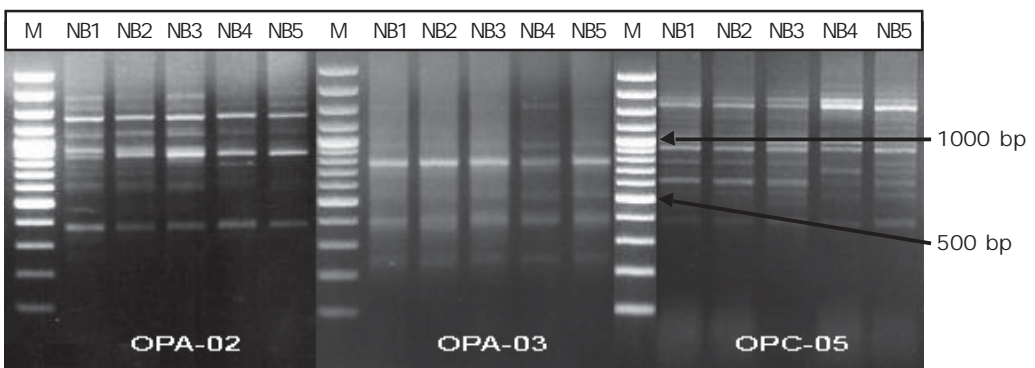
Populasi <i>Population</i>	Jumlah fragmen <i>Number of fragments</i>	Kisaran ukuran <i>Range of sizes (bp)</i>
BR (BEST X Red NIFI)	15-20	225-2,000
RB (Red NIFI X BEST)	18-20	225-2,000
BN (BEST X Nirwana)	20-27	200-2,000
NB (Nirwana X BEST)	17-21	250-2,000
RN (Red NIFI X Nirwana)	18-22	225-2,000
NR (Nirwana X Red NIFI)	17-22	200-2,000
BB (BEST X BEST)	21-25	200-2,000
RR (Red NIFI X Red NIFI)	22-24	225-2,000
NN (Nirwana X Nirwana)	20-23	225-2,000



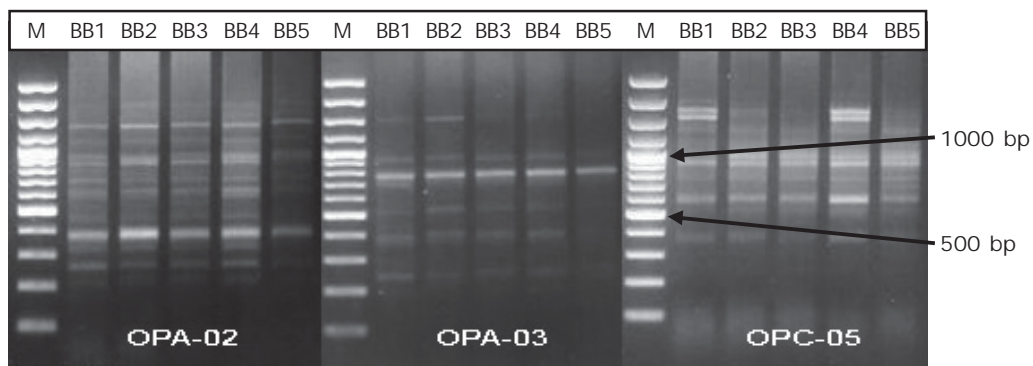
Gambar 1. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi BEST X Nirwana
Figure 1. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPC-05 in BEST X Nirwana populations



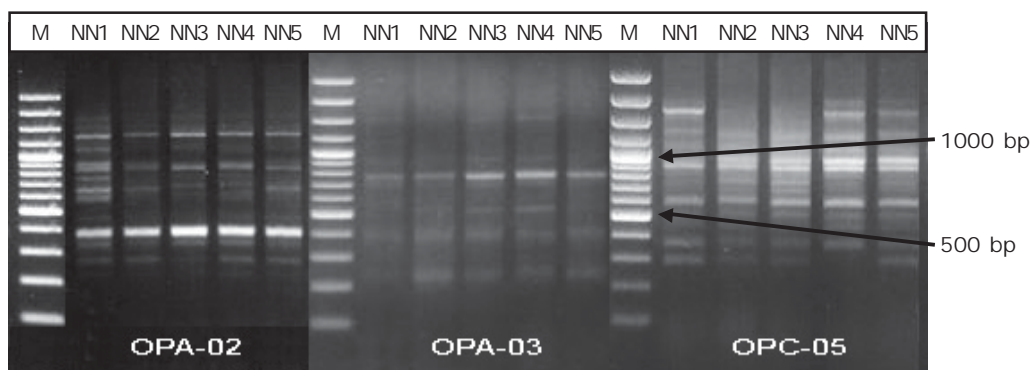
Gambar 2. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi BEST X Red NIFI
Figure 2. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPC-05 in BEST X Red NIFI populations



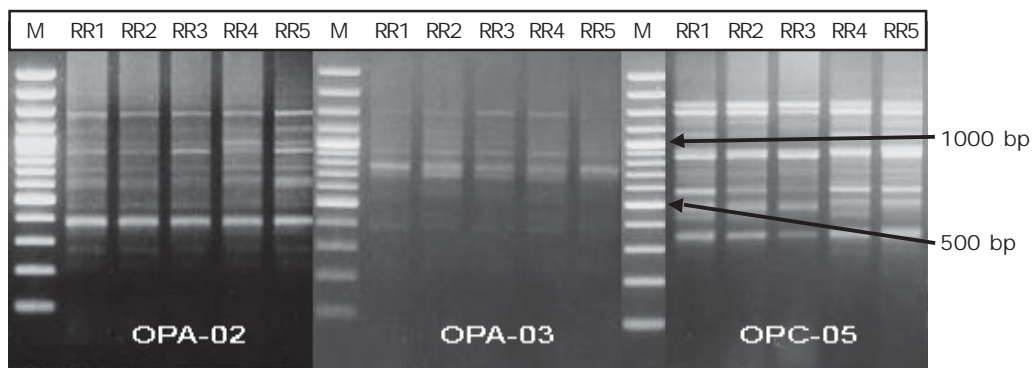
Gambar 3. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi Nirwana X BEST
Figure 3. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPC-05 in Nirwana X BEST populations



Gambar 4. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi BEST X BEST
Figure 4. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPA-05 in BEST X BEST populations



Gambar 5. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi Nirwana X Nirwana
Figure 5. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPA-05 in Nirwana X Nirwana populations



Gambar 6. Hasil amplifikasi primer OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 pada populasi Red NIFI X Red NIFI
Figure 6. Results of amplification of primers OPA-02, OPA-03, and OPA-05 in Red NIFI X Red NIFI populations

Tabel 2. Persentase polimorfisme dan heterozigositas pada populasi ikan uji

Table 2. Percentage of polymorphism and heterozygosity of test fish populations

Populasi <i>Population</i>	Polimorfisme <i>Polimorphism (%)</i>	Heterozigositas <i>Heterozygosity</i>
BR	36.3636	0.1370
RB	18.1818	0.0733
BN	42.4242	0.1564
NB	33.3333	0.1349
RN	21.2121	0.0831
NR	33.3333	0.1345
BB	24.2424	0.1067
RR	24.2424	0.0954
NN	12.1212	0.0514

Tabel 3. Nilai P dari uji perbandingan berpasangan Fst

Table 3. P value of Fst pairwise comparison test

Populasi <i>Population</i>	BR	RB	BN	NB	RN	NR	BB	RR	NN
BR	*****								
RB	0.0110	*****							
BN	0.0000	0.0000	*****						
NB	0.0000	0.0000	0.0000	*****					
RN	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	*****				
NR	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	*****			
BB	0.0000	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0057	*****		
RR	0.0000	0.0042	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3561	*****	
NN	0.0001	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	*****

Keterangan: Semuanya berbeda nyata ($P < 0,05$), kecuali antara BB dengan RR

Note: All of values are significantly different ($P < 0.05$), except between the BB and RR

Jarak genetik tertinggi antara populasi BEST X Red NIFI dengan BEST X Nirwana dan terendah antara populasi BEST X BEST dengan Red NIFI X Red NIFI (Tabel 4). Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut disajikan pada Gambar 7.

Hasil amplifikasi dari ketiga primer yakni OPA-02, OPA-03, dan OPC-05 menghasilkan jumlah fragmen antara 15–27 buah dengan ukuran berkisar antara 200–2000 bp (Tabel 1). Hasil amplifikasi setiap primer memiliki karakter yang berbeda sehingga jumlah dan ukuran

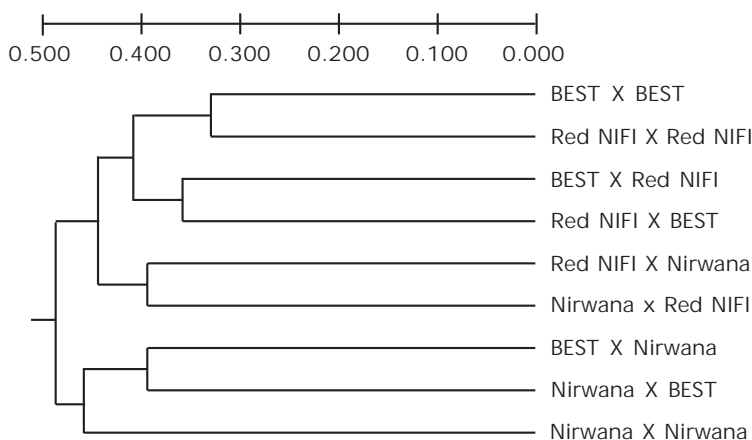
fragmen yang muncul juga berbeda. Frekuensi allele yang semakin besar mengindikasikan bahwa kemunculan fragmen semakin dominan pada lokus tertentu (monomorfik). Adanya fragmen yang spesifik (polimorfik) berpotensi untuk meningkatkan nilai heterozigositas, yang mengindikasikan semakin tingginya keragaman genetik.

Hasil analisis dengan menggunakan TFGA menunjukkan bahwa nilai polimorfisme ikan uji berkisar antara 12,1212%–42,4242% dan heterozigositas 0,0514–0,1564 (Tabel 2). Nilai

Tabel 4. Jarak genetik sembilan populasi ikan uji

Table 4. Genetic distance of nine populations of test fish

Populasi Population	BR	RB	BN	NB	RN	NR	BB	RR	NN
BR	*****								
RB	0.3735	*****							
BN	0.5300	0.5024	*****						
NB	0.4838	0.4930	0.4022	*****					
RN	0.4990	0.4035	0.5004	0.4968	*****				
NR	0.4675	0.4020	0.4888	0.4445	0.4005	*****			
BB	0.4536	0.4033	0.4143	0.4855	0.4727	0.3940	*****		
RR	0.4460	0.3638	0.4948	0.4932	0.4119	0.4834	0.3294	*****	
NN	0.4539	0.4905	0.4785	0.4328	0.4746	0.5208	0.4643	0.3966	*****



Gambar 7. Dendrogram dari sembilan populasi ikan uji

Figure 7. Dendrogram of nine populations of test fish

keragaman genetik tertinggi didapatkan pada populasi hasil hibridisasi antara BEST dengan Nirwana, kemudian diikuti oleh populasi BEST dengan Red NIFI, Nirwana dengan BEST, Nirwana dengan Red NIFI dan terendah pada Red NIFI dengan Nirwana. Sedangkan pada populasi *true breeding* hasil keragaman genetik tertinggi ditunjukkan pada populasi BEST, diikuti Red NIFI dan terendah pada populasi Nirwana.

Pada populasi hasil hibridisasi diperoleh rata-rata nilai polimorfisme sebesar 30,8080% dan heterozigositas 0,1197; sedangkan pada populasi *true breeding* rata-rata nilai polimorfisme 20,2020% dan heterozigositas 0,0845. Dengan demikian terjadi peningkatan

nilai polimorfisme 10,6060% dan heterozigositas 0,0352. Hal ini menunjukkan bahwa hibridisasi dapat meningkatkan nilai keragaman genetik dari suatu populasi ikan. Pada dasarnya hibridisasi adalah memanfaatkan sifat heterosis karena sifat dominan dan heterozigositas pada banyak lokus (Tave, 1993) atau interaksi dari alel pada lokus.

Perbedaan polimorfisme genetik dapat dipengaruhi oleh 4 model utama peubah komponen yaitu migrasi, seleksi, mutasi dan *random-metode*. Masuknya sumber genetik baru dari sumber lain diduga dapat menjadi penyebab perubahan genetik pada populasi ikan melalui hibridisasi. Nila BEST, Nirwana, dan Red NIFI memiliki proses seleksi yang berbeda.

Ikan nila BEST merupakan ikan hasil pemuliaan untuk karakter keunggulan pertumbuhan yang dihasilkan melalui proses selama 4 tahun penelitian oleh Tim Peneliti dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar Bogor (Arifin, 2008).

Nilai heterozigositas menunjukkan keragaman genetik dari suatu populasi. Heterozigositas yang tinggi memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksploitasi gen-gen yang menguntungkan. Genotip heterozigositas resesif mengakibatkan detrimental yaitu kekurangan enzim penting yang diproduksi oleh alel yang dominan yang berhubungan dengan penurunan fekunditas, penurunan daya hidup atau peningkatan mortalitas, penurunan daya tahan terhadap penyakit dan laju pertumbuhan. Variasi genetik suatu makhluk hidup dapat muncul karena mutasi, seleksi alam, pengaruh lingkungan, dan perkawinan. Apabila faktor di atas muncul dapat menyebabkan terjadinya perubahan genetik suatu individu dan selanjutnya terjadi perubahan susunan genetik populasi yang terbentuk dari individu tersebut (Sugama *et al.*, 1996).

Hasil analisis statistik menggunakan uji perbandingan berpasangan F_{st} menunjukkan bahwa terdapat perbedaan genetik secara nyata antar populasi ikan uji ($P > 0,05$), kecuali antara populasi BEST X BEST dan Red NIFI X Red NIFI tidak berbeda nyata (Tabel 3). Perbedaan yang nyata menunjukkan adanya perbedaan karakter genetik maupun asal-usul dari induknya.

Jarak genetik tertinggi ditunjukkan antara populasi BEST X Red NIFI dengan BEST X Nirwana dan terendah antara populasi BEST X BEST dengan Red NIFI X Red NIFI. Jarak genetik merupakan ukuran perbedaan genetik antar famili yang dihitung berdasarkan frekuensi alel (Nei, 1987). Semakin kecil jarak genetik antar individu dalam satu famili, maka famili tersebut semakin seragam (Koh *et al.*, 1999). Menurut Pandin (2000), tingkat kemiripan genetik dari suatu populasi dapat digambarkan oleh jarak genetik dari individu-individu anggota populasi. Semakin besar jarak genetik individu di dalam suatu populasi, maka populasi tersebut memiliki anggota yang semakin beragam.

Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik membentuk 2 cluster besar. *Clus-*

ter pertama kemudian terbagi lagi menjadi 2 *cluster* yaitu pertama terdiri atas populasi nila BEST dengan Red NIFI dan hasil hibridisasinya dan kedua terdiri atas populasi hasil hibridisasi Red NIFI dengan Nirwana. Cluster kedua terdiri atas populasi Nirwana dan hasil hibridisasinya dengan nila BEST. Terdapat kedekatan hubungan kekerabatan antara populasi *true breeding* BEST X BEST dengan Red NIFI X Red NIFI. Kedekatan hubungan kekerabatan ini menunjukkan adanya kesamaan asal-usul induk.

KESIMPULAN

Hasil analisis terhadap populasi hasil hibridisasi antara nila BEST dengan Nirwana dan Red NIFI menunjukkan bahwa persentase polimorfisme berkisar antara 18,1818%–42,4242%; dengan nilai heterozigositas 0,0733–0,1564 dan jarak genetik antar populasi 0,3735–0,5300. Keragaman genetik tertinggi diperoleh pada hasil hibridisasi antara nila BEST dengan Nirwana.

Nilai polimorfisme meningkat sebesar 10,6060% dan heterozigositas 0,0352 pada populasi hasil hibridisasi dibandingkan dengan populasi *true breeding*. Hal ini menunjukkan bahwa hibridisasi dapat meningkatkan nilai keragaman genetik dari suatu populasi ikan.

DAFTAR ACUAN

- Arifin, O.Z. 2008. Nila BEST (Bogor Enhanced Strain Tilapia). www.blogspot.com (8 Agustus 2010).
- Ariyanto. 2003. Ikan mas hibrida antara harapan dan kenyataan. *Warta Penelitian dan Perikanan Indonesia*, 9(3): 2–6.
- Gustiano, R., Arifin, O.Z., & Nugroho, E. 2008. Perbaikan pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan seleksi famili. *Media Akuakultur*, 3(2): 98–106.
- Gustiano, R. & Arifin, O.Z. 2010. Menjaring laba dari budidaya nila BEST. IPB Press. Bogor, 81 hlm.
- Kapunskinski, A.R. & Jacobson, L.D. 1987. Genetic guidelines for fisheries management. University of Minnesota, USA, 66 pp.
- Koh, T.L., Khoo, G., Li Qun Fan, & Phang, V.P.E. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of discus (*Symphysodon* spp.) as revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 485–497.

- Leary, R.F., Allendorf, F.W. , & Knudsen, K.L. 1985. Development instability and high meristic counts in interspecific hybrid of salmonid fishes. *Evolution*, 39(6): 1318-1326.
- Miller, M.P. 1997. Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3. Department of biological science. Northern Arizona University, Arizona, USA, 30 pp.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York, 512 pp.
- Nugroho, E., Takagi, M., & Taniguchi, N. 1997. Practical manual on detection of DNA polymorphism in fish population study. *Bulletin of marine sciences and fisheries*, Kochi University, 17: 109-129.
- Pandin, D.S. 2000. *Kemiripan Genetik Populasi Kelapa dalam Mapanget Tenga, Bali, Palu dan Sawarna Berdasarkan Penanda RAPD*. Tesis. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Sugama, K., Haryanti, & Cholik, F. 1996. Biochemical genetics of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Description electrophoresis detectable loci. *Indonesian Fish. Res. J.*, II (1): 19-28.
- Tave, D. 1993. *Genetics for fish managers*. The AVI Publ. Comp. Inc. NY, USA, 418 pp.