

Keragaman Gen Cytochrome B Pada Sidat (*Anguilla bicolor*) Berdasarkan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Lestari Wilujeng
Program Studi S2 Bioteknologi Perikanan dan Kelautan,
Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga Email:
lestari-w-11@fpk.unair.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakter genetik *Anguilla bicolor* berdasarkan gen *cytochrome b* sebagai informasi dasar dalam studi filogeni dan rekayasa genetika. Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Mei sampai September 2013 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Penelitian ini menggunakan metode survei dengan analisis deskriptif kualitatif di laboratorium. Sampel diperoleh dari penangkapan langsung di Pantai Popo Tulungagung, Manado, Medan dan Ciamis. Penelitian ini dimulai dengan isolasi DNA menggunakan metode CTAB dan dilanjutkan dengan PCR. Primer yang digunakan yaitu *cytb-1* (5'-TGCTAACGATGCCCTAGTGG-3') dan *cyt b-2* (5'-CTAGTCAACCTACT-AATGGG-3'). Hasil PCR dipotong dengan menggunakan enzyme restriksi *Hha1* dan *Msp1*. Analisis data dilakukan dengan bantuan program Software NTSYS. Karakter genetik berupa urutan basa nukleotida penyusun DNA dari gen *cytochrome b* yang diperoleh pada masing-masing sampel memiliki tingkat kesamaan sekitar 32 – 100 %..

ABSTRACT

This study aims to analyze the genetic character of *Anguilla bicolor* based on *cytochrome b* gene as the basis of information in the study of phylogeny and genetic engineering . The research was conducted from May to September 2013 in the Laboratory of Biotechnology Faculty of Science, University of Brawijaya . This study uses a survey with qualitative descriptive analysis in the laboratory . Samples obtained from direct arrests in Tulungagung Popo Beach , Manado , Medan and Cilacap . . Study was initiated by DNA isolation using CTAB method and followed by PCR . Primers used were *cytb - 1* (5' - TGCTAACGATGCCCTAGTGG - 3 ') and *b CYT - 2* (5' - CTAGTCAACCTACT - AATGGG - 3 ') . PCR results were cut using restriction enzymes and *Msp1 Hha1* . Data analysis was performed with the aid of NTSYS software program . Genetic character of a sequence of nucleotide bases making up DNA from the *cytochrome b* gene were obtained on each sample has a degree of similarity around 32 - 100 %.

Keywords : *Cytochrome b*, *Anguilla bicolor*, RFLP-mtDNA

PENDAHULUAN

Satu diantara komoditas perikanan yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan saat ini sedang dikembangkan adalah ikan sidat (*Anguila bicolor*). Permintaan akan sidat cukup tinggi baik lokal maupun ekspor, sementara potensi sidat di sebagian perairan Indonesia pada tahun 2000 semakin menurun. Sampai saat ini seluruh ekspor sidat masih merupakan hasil tangkapan dari alam, yang dikhawatirkan akan mempengaruhi Populasi di alam, karena pengambilan sidat secara terus menerus dalam jumlah besar dapat menyebabkan stok di alam berkurang drastis. Produksi sidat pada tahun 1990 mencapai 41,5 ton dan pada tahun 1996 menurun hingga 29,1 ton (Haryani, 1999).

Upaya untuk memenuhi permintaan akan sidat harus sudah mulai dipenuhi dengan budidaya yang tentu saja diawali dengan penyediaan benih yang berkualitas, cukup dan berkesinambungan.

Karakteristik ikan sidat perlu diteliti terutama secara genetiknya, hal ini diperlukan terutama dalam upaya pembenihan sidat, dengan memahami dan mengetahui inventarisasi dan evaluasi karakteristik genetik sidat dari beberapa populasi, dapat digunakan sebagai informasi awal atau bahan pertimbangan dalam pelaksanaan *breeding program*. Sistem pewarisan sifat mtDNA dilakukan secara maternal tanpa rekombinasi. Selain itu dalam mtDNA ini terjadi laju mutasi yang tinggi, sehingga mtDNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan keragaman genetik antar individu dalam suatu populasi, hubungan evolusi di antara populasi dan rekonstruksi migrasi suatu populasi (Toha, 2001).

Keragaman genetik dapat muncul karena adanya mutasi, seleksi alam, pengaruh lingkungan dan perkawinan (Warwick dkk. 1987). Gen yang digunakan untuk mengetahui keragaman pada sidat adalah gen cythochrome b.

langsung dianalisis dengan elektroforesis atau disimpan di dalam refrigerator.

Gel agarose dibuat dengan cara memanaskan di atas *hotplate* dan diaduk rata. Setelah gel larut dan berwarna bening, larutan tersebut dibiarkan sampai hangat, kemudian teteskan etidium bromida sebanyak 0,1 ml; kemudian dituangkan ke dalam cetakan yang telah terpasang sisir pembuat lubang dengan ketebalan 3-5 mm, selanjutnya gel yang berisi *buffer* elektroforesis.

Hasil PCR divisualisasikan dengan menggunakan gel agarosa 1.5%. sebanyak 0.45 gram agarosa dilarutkan dalam 30 ml larutan TBE buffer pH ~8.3 (45 mM Tris, 45 mM boric acid, 2 mM Na₂EDTA pH 8.3) dan dididihkan. Setelah mendidih larutan agarosa didinginkan lalu ditambahkan 0.5 µl etidium bromide

Sekuen gen *cyt b* yang berasal dari sidat (*Anguila bicolor*) mempunyai panjang sekuen 15573 pb (NCBI 2013). Adapun tempat asal atau habitat sidat yang digunakan berasal dari Tulungagung, Malang, Medan dan Lampung. Pemilihan empat lokasi pengambilan sidat karena di empat tempat tersebut banyak ditemukan sidat yang khusus spesies *Anguila bicolor*

BAHAN UJI

Ikan uji atau sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan sidat (*Anguila bicolor*) yang diperoleh dari hasil tangkapan nelayan di Perairan Umum Manado, Lampung, Cilacap dan Tulungagung. Jumlah sampel di setiap lokasi yang digunakan untuk uji genetik adalah 3 ekor dengan ukuran panjang sekitar 7 – 10 cm dan berat 8 – 15 gram.

Amplifikasi mtDNA dengan PCR

DNA Mitokondria diamplifikasikan menggunakan primer universal Cytochrome b (*Cyt b-1*) *forward*: 5'-TGCTAACGATGCCCTAGTGG-3' dan *Cyt b-2*: 5'-CTAGTCAACCTACT-AATGGG-3'. (Williams dan Benzie, 1997). Amplifikasi dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi 4 µl ddh₂O, 2 µl primer F (30 pmol/µl), 2 µl primer R (30 pmol/µl), 10 µl go tag green (promega) dan 2 µl DNA dimasukkan ke dalam PCR tube. Amplifikasi dilakukan dengan program predenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, *denaturasi* pada suhu 95°C selama 45 detik, *annealing* pada suhu 62°C selama 45 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 45 detik, sebanyak 35 siklus. Lalu ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR dapat Retriksi.

Siapkan tabung propilen 50 ml. Masukkan 4617 µl akuades, 2833 µl poliakrilamid 30%, 850 µl TBE buffer 10x, 195 µl APS dan 5 µl TEMED ke dalam tabung propilen. Masukkan larutan ke dalam plate sampai penuh dan pasang sisiran pada plate. Plate berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis dan masukkan sebanyak 350 ml TBE buffer 1x ke dalam chamber elektroforesis. Pada sumur pertama sebanyak 2 µl Marker DNA ladder. Sumur ke dua dan seterusnya dimasukkan sebanyak 10 µl sampel hasil PCR-RFLP dicampur dengan 2 µl loading dye. Runing dilakukan dengan tegangan

dan dituang dalam cetakan gel yang telah dipasang sisiran. gel dan cetakannya ditempatkan dalam chamber elektroforesis yang berisi 300 ml TBE buffer. Hasil PCR sebanyak 5 µl dimasukkan dalam sumuran gel dan di elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Kemudian gel divisualisasi dengan menggunakan UV transiluminator (Bio-rad) dan difoto dengan DSLR D1100 *syngene genetic tool*.

Digesti mtDNA dengan enzim restriksi

Digesti mtDNA dilakukan menggunakan enzim restriksi. Enzim restriksi yang digunakan adalah *HindIII*, *EcoRI*, *HhaI* dan *MspI*. Tahapannya adalah mencampur 6 µl dH₂O; 3 µl DNA hasil amplifikasi PCR, *buffer* enzim 1 µl, enzim restriksi 1 µl sehingga total larutan 10 µl dalam tabung PCR steril dan dilakukan on ice karena enzim sangat sensitif terhadap suhu dan mudah rusak kemudian campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1-4 jam, selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk mengetahui hasil digesti enzim dan untuk pengamatan jumlah dan ukuran fragmen

- H : keragaman haplotipe
- N : jumlah sampel
- Xi : frekuensi haplotipe sampel ke-i

$$D = -\ln I$$

$$I = \frac{\sum_{i=1}^m (p_{ix} \times p_{iy})}{\sqrt{(\sum_{i=1}^m p_{ix}^2)(\sum_{i=1}^m p_{iy}^2)}}$$

- Pix : frekuensi alel ke-i dari populasi X
- Piy : frekuensi alel ke-i dari populasi Y
- D : jarak genetik

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Amplifikasi daerah *cyt b* mtDNA pada Sidat (*Anguila bicolor*) menggunakan primer Cytochrome b (*Cyt b-1*) *forward* : 5'-TGCTACGATGCCCTAGTGG - 3' dan *Cyt b-2*: 5'-CTAGTCAACCTACT - AATGGG - 3' menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 1039 bp (*base pairs*) pada semua sampel lokasi yaitu Medan, Manado, Cilacap dan Tulungagung. (Gambar.1)

Dari empat enzyme yang digunakan untuk memotong template mt-DNA tersebut (*HindIII*, *EcoRI*, *HhaI* dan *MspI*), hanya 2 enzim yang

dasar gel. Gel dilepaskan dari plate dan dimasukkan ke dalam kotak plastik. Gel diberi larutan fiksatif (10% ethanol, 0.5% asam asetat glasial) dan difiksasi selama 20 menit. Kemudian gel diwarnai dengan 0.05 % perak nitrat dan 0.05% formaldehid. Shaking selama 20 menit. Gel kemudian dicuci selama 1 menit dengan akuades. Gel diberi NaOH 2.5 % dan 0.05% formaldehid lalu shaking sampai muncul pita.

ANALISA DATA

Analisa data dilakukan dengan metode deskriptif berdasarkan parameter keragaman haplotipe (h) dan jarak genetik antar populasi (Nei, 1987, dan Kumar 2000). Hubungan kekerabatan dan perbedaan jarak genetik yang nyata diilustrasikan dalam bentuk dendrogram. Persamaan matematika keragaman haplotipe dan jarak genetik secara berturut turut sebagai berikut :

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum X_i^2 \right)$$

Rekapitulasi identifikasi genotype (tipe restriksi) mtDNA teramplifikasi hasil digesti dengan dua enzim (*HhaI* dan *MspI*) disajikan dalam Tabel 2.

Hasil pemotongan yang menunjukkan ukuran panjang fragmen berbeda akan memberikan tipe pemotongan (haplotipe) yang berbeda pula. Tipe pemotongan yang berbeda pada setiap individu dalam suatu populasi maupun antara populasi dapat disebabkan oleh terjadinya pergantian, penambahan atau hilangnya basa tertentu pada urutan basa D-Loop mtDNAny. Sehingga Enzim tertentu tidak memotong pada situs yang sama. Hal ini mengakibatkan terjadinya pergeseran situs pemotongan. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan urutan pasangan basa pada individu yang mempunyai tipe pemotongan basa yang berbeda. Hal ini mengakibatkan adanya keragaman genetik di dalam populasi dan antara populasi.

Keragaman Genetik

Hasil pemotongan produk PCR dengan menggunakan 2 enzim restriksi menghasilkan lima *haplotipe* mt DNA D-Loop region. Tipe *composite haplotipe* yang diperoleh disajikan dalam Tabel 3.

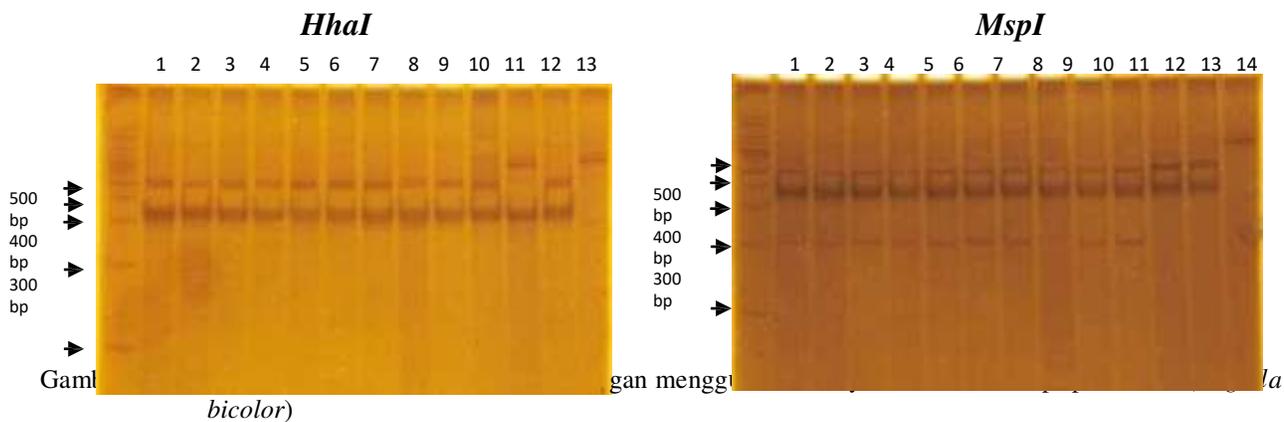
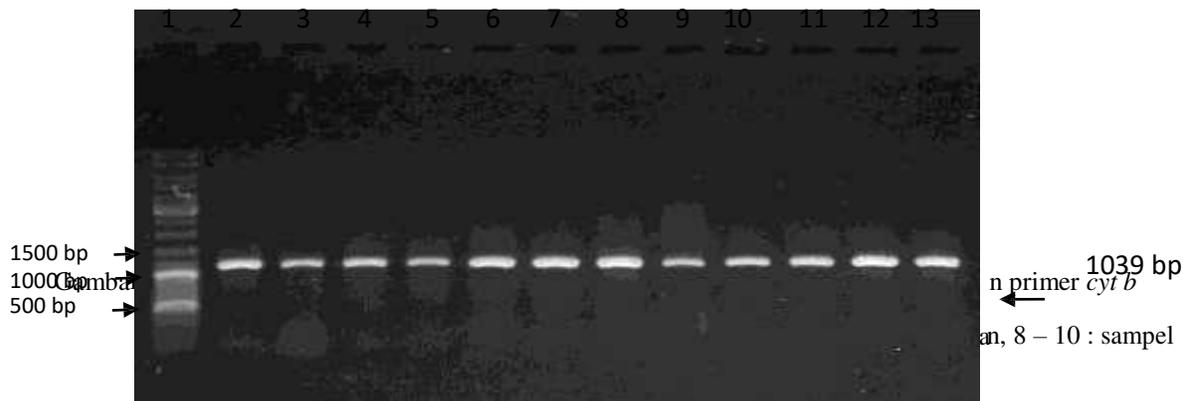
mempunyai sisi pemotongan yaitu *HhaI* dan *MspI*. Pemotongan fragmen mt-DNA dengan menggunakan enzyme *HhaI* menghasilkan dua jenis pola restriksi sedangkan enzyme *MspI* menghasilkan tiga tipe pola restriksi. (Gambar 2)

Panjang fragmen mt-DNA untuk masing-masing enzim restriksi dapat dilihat pada table 1. Dari table terlihat bahwa Digesti fragmen mtDNA teramplifikasi dengan enzim restriksi *HhaI* menghasilkan dua tipe yaitu A (523, 516 pb), dan B (147, 892 pb).

Sedangkan digesti enzim restriksi *MspI* menghasilkan tiga tipe yaitu A (203, 325, 511 pb), B (203, 415, 415 pb) dan C (511, 528 pb).

pemotongan) yang berbeda.

Analisis *composite* haplotipe menghasilkan tiga *composite haplotipe* pada seluruh kelompok sampel, nilai keragaman haplotipe bervariasi antara (0.0) (Sampel Manado, Medan Cilacap) sampai 0.2 (sampel Tulungagung) (Tabel 3). Jumlah terendah yang diamati adalah pada kelompok sampel Manado, Medan Cilacap (satu *composite haplotipe*). Sedangkan jumlah yang tertinggi terdapat pada kelompok sampel Tulungagung (tiga *composite haplotipe*).



Tabel 1. Tipe fragmen restriksi mtDNA daerah *cyt b* dengan dua enzim restriksi *HhaI* dan *MspI*

Panjang fragmen (bp)	Enzim				
	<i>HhaI</i>		<i>MspI</i>		
	A	B	A	B	C
892					
528					
523					
516					

511					
415					
325					
203					
147					
Total	2	2	3	3	2

Tabel 2. Distribusi genotype (tipe restriksi) pada empat populasi sidat

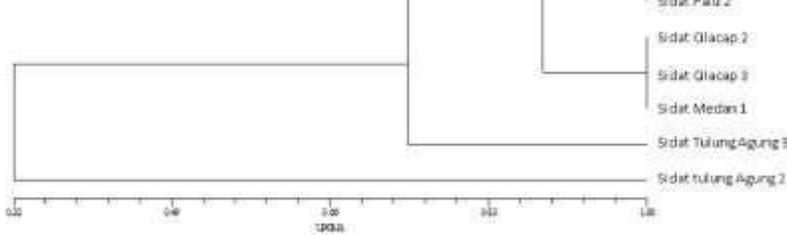
Enzim	Type restriksi	Medan	Manado	Cilacap	Tulungagung
<i>Hha</i> 1	A	3	3	3	1
	B	-	-	-	2
<i>Msp</i> 1	A	3	3	3	1
	B	-	-	-	1
	C	-	-	-	1

Tabel 3. Distribusi frekuensi dan komposit haplotipe pada empat populasi sidat (*Anguila bicolor*)

No	Composite haplotipe	Total	Medan	Manado	Cilacap	Tulungagung
1	AA	10	0.3	0.3	0.3	0.1
2	BB	1	-	-	-	0.1
3	AC	1	-	-	-	0.1
Jumlah sampel		12	3	3	3	3
Jumlah haplotipe		5	1	1	1	3
Keragaman haplotipe			0.0	0.0	0.0	0.2

Jarak genetik antar populasi (D) dan dendogram hubungan kekerabatan antar populasi (filogeni) pada empat populasi sidat menurut metode UPMGA dengan menggunakan program software TFPGA disajikan dalam Tabel 4

Hasil perhitungan jarak genetik menunjukkan jarak terkecil (terdekat) antara populasi Medan, Manado dan Cilacap yaitu sebesar 0.0000, sedangkan jarak genetik terbesar (terjauh) adalah populasi Tulungagung yaitu 0.0017



Berdasarkan dendrogram kekerabatan empat populasi sidat (*Anguila bicolor*) menunjukkan bahwa nilai similaritas dari sampel sebagai berikut sidat cilacap 1, Medan 2, Medan 3, Manado 1, Manado 3, tulung agung 1 dan Manado 2 mempunyai nilai similaritas 100%. Sidat cilacap 2, sidat cilacap 3 dan medan 1 mempunyai nilai similaritas 100%.

Antara kelompok sidat Cilacap 1, Medan 2, Medan 3, Manado 1, Manado 3, Tulungagung 1 dan Manado 2 dan kelompok Sidat Cilacap 2, sidat Cilacap 3 dan Medan 1 mempunyai nilai similaritas sebesar 88.9%. Sidat Tulungagung 3 terhadap kelompok sidat Cilacap 1, Medan 2, Medan 3, Manado 1, Manado 3, Tulungagung 1 dan Manado 2 dan kelompok Sidat Cilacap 2, sidat Cilacap 3 dan Medan 1 mempunyai nilai similaritas sebesar 74.4%.

Sidat Tulungagung 2 terhadap Sidat Tulungagung 3, kelompok sidat Cilacap 1, Medan 2, Medan 3, Manado 1, Manado 3, Tulungagung 1 dan Manado 2 serta kelompok Sidat Cilacap 2, sidat Cilacap 3 dan Medan 1 mempunyai nilai similaritas sebesar 32.2%.

Tinggi rendahnya keragaman haplotipe genetik dapat diindikasikan dari jumlah maupun keragaman haplotipe (h) dan nukleotida. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini terindikasi tiga tipe composite haplotipe. Jumlah haplotipe ikan sidat yang dimiliki oleh masing masing sampel untuk sampel dari Manado, Medan dan Cilacap memiliki satu composite haplotipe yang sama. Distribusi composite haplotipe menunjukkan ciri khas ikan sidat pada masing-masing lokasi. Secara keseluruhan keragaman haplotipe wilayah Medan, Manado dan Cilacap adalah seragam (0.0), sedangkan sampel ikan sidat dari Tulungagung mempunyai nilai keragaman haplotipe (0.2).

Keragaman genetik antar populasi dapat

Tingginya nilai keragaman haplotipe di Tulungagung ini disebabkan oleh kondisi perairan pantai di Tulungagung yang mempunyai tingkat produktifitas kesuburan yang tinggi, sehingga sidat dari Tulungagung secara genetik mempunyai sifat yang lebih unggul. Terkait dengan kondisi lingkungan perairan yang berbeda dari pengambilan sampel diduga memberi pengaruh terhadap munculnya keragaman genetik populasi sidat. Seperti pada sidat dari Tulungagung yang mempunyai nilai keragaman haplotipe yang tinggi (0.2) Hal ini terkait dengan kemampuan individu menyediakan ragam genetik alam mekanisme evolusi sehingga bertahan hidup dan bereproduksi. Koen et al (1976) menyatakan bahwa perbedaan genetik dapat terjadi karena letak geografis, perbedaan salinitas dan suhu. Perubahan keragaman alel yang mempengaruhi keragaman genetik juga disebabkan oleh migrasi, seleksi dan *genetic drift* (Frankham et al 2002).

Berdasarkan tipe haplotipe sampel dari Medan dan Cilacap AA juga ditemukan pada sampel dari Tulungagung, hal ini menunjukkan kedekatan secara geografis dan pertukaran populasi sidat terkait budaya yang dilakukan. Nilai keragaman haplotipe yang rendah dari rata-rata sidat di tiga lokasi sesuai dengan pendapat Sugama dan Hutapea bahwa populasi dengan laju migrasi yang sempit atau jarak yang pendek mempunyai heterosigositas yang rendah bila dibandingkan dengan populasi yang mempunyai migrasi yang luas dan bersifat terbuka. Terjadinya pertukaran gen dalam melakukan perkawinan dapat mengakibatkan perkawinan sekerabat yang bila terjadi secara berulang-ulang dapat mengakibatkan rendahnya variasi genetik / munculnya peluang homosigositas akan lebih tinggi.

dicirikan dari jarak genetik dalam klasifikasi atau pengelompokan ikan menggambarkan perbedaan nilai suatu ciri antara kelompok ikan yang dibandingkan. Semakin kecil nilai jarak genetik, semakin kecil pula keragamannya antar populasi tersebut demikian pula sebaliknya.

Analisis dendrogram berdasarkan UPGMA menunjukkan ada strukturisasi genetik sebagai gambaran pemisahan kelompok menjadi dua unit populasi, yaitu kelompok pertama yang terdiri dari sampel sidat dari Manado, Medan dan Cilacap dan kelompok II sampel sidat dari Tulungagung. Jarak genetik dan pola migrasinya diperkirakan mempengaruhi pemisahan kelompok sidat. Secara berturut turut nilai jarak genetik kedua populasi tersebut adalah 0.0000 dan 0.0017

Ilustrasi dendrogram memberikan informasi kekerabatan dari keempat lokasi sampel pengambilan. Pola kekerabatan suatu ikan terjadi karena adanya penyebaran dan proses migrasi (ruaya). Adanya pemisahan populasi ikan sidat pada keempat lokasi pengambilan sampel diperkirakan terkait dengan faktor oseanografi dan geografis.

Sidat muda hidup selama beberapa tahun di sungai-sungai untuk melengkapi siklus reproduksinya. Ikan sidat mampu mencapai jarak perjalanan ruaya hingga 4000 mil. Selama melakukan ruaya pemijahan, induk sidat mengalami percepatan pematangan gonad dari tekanan hidrostatis air laut. Proses pemijahan berlangsung pada kedalaman 400 m, sehingga pengaruh hidrostatis permukaan air lebih kecil dibandingkan dengan kondisi hidrostatis perairan lapisan dalam dan pengaruh lebih besar terjadi pada fase dispersal dan larva yang bersifat planktonik. Letak geografis yang relatif dekat mengakibatkan ketiga sampel dari lokasi berada dalam satu kelompok ($D = 0.000$).

- Botstein., D.R., R.L White, M.Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in man Using Restriction Fragment Length Polymorphism, *Am.J.Hum.Gen.* 32:31-314-331
- Brown, T. A. 1991. Pengantar Kloning Gen. Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica
- Desjardin, P. and R. Moris. 1990. Sequence and gene organization of chicken mitochondria genom. A novel gene order in higher vertebrate. *J.Mol.Biol.* 212:599-624.
- Duryadi, 1994. Peran DNA Mitokondria (mt DNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi pada hewan. Hayati, *Jurnal Biologi FMIPA IPB.* 1(1):1-4
- Effendie, M.I. 1997. Biologi Perikanan, Yayasan Pustaka Nusatama, Yogyakarta, 163 p

KESIMPULAN

1. Keragaman haplotipe (genetik) dari empat populasi sampel ikan sidat bervariasi antara 0.0 – 0.2. Keragaman haplotipe terendah 0.0 terdapat pada kelompok sampel Manado, Medan dan Cilacap dan yang tertinggi 0.2 terdapat pada kelompok sampel Tulungagung.
2. Jarak genetik antar kelompok sampel berkisar antara 0.000 – 0.0017. Jarak genetik terdekat adalah antara kelompok sampel Manado, Medan dan Cilacap sedangkan jarak genetik terjauh sampel Tulungagung dengan nilai jarak genetik 0.0017.
3. Dendrogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik menunjukkan bahwa kelompok sidat yang diamati dapat dibagi menjadi dua kelompok populasi yaitu kelompok pertama terdiri dari ikan sidat yang berasal dari kelompok sampel Manado, Medan, Cilacap sedangkan kelompok kedua berasal dari sampel Tulungagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aoyama, J., H. Sugeha, dan K. Tsukamoto. 2006. Downstream Migration of Tropical Anguillid Silver Eels. *Prosiding Seminar Nasional Limnologi* 2006
- Avis, J.C. Lansman and R.O. Shade. 1979. The use Endonuclease to Measure Mitochondria DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. I. Population Structure and Evolution in Genus *Peromyscus*. *Genetic* 92:279-295
- Lutjanus malabaricus) Stock Discrimination Using Genetic Variation in Mitochondrial DNA. Molecular Fisheries Laboratory Southern Fisheries Centre. Produced for CSIRO Marine Laboratories as Part of The ACIAR Indonesia Snapper Project
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M. and Taniguchi, N. (2007). Genetic Variability And Pedigree Tracing Of A Hatchery-Reared Stock Of Redsea Bream (*Pagrus Major*) Used For Stock Enhancement, Based On Microsatellite DNA markers.

- Hardys, H., M. Balick, and B. Schiewater, 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Mol Ecol. 1: 56 – 63.
- Kocher T.D., Lee W.J., Sobolewska H., Penman D. & McAndrew B. 1989. A Genetic Linkage Map Of A Cichlid Fish, The Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics 148.
- Maniatis, T. Sambrook, J. and Fritsch, E.F. 1989. Molecular Cloning (2th ed.). Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Moria, S.B. Haryanti. Permana, I. G. N and Sugama, K. 2001. Keragaman dan Kekerabatan Tiga Spesies Kerapu *Epinephelus* spp. Dengan Metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) mtDNA. Teknologi Budidaya Laut dan Pengembangan Sea Farming di Indonesia. Jakarta: Departemen Kelautan dan Perikanan. Hal. 285-292
- Nelson, J.S. 1994. Fishes of The World, 3rd editions. John Wiley and Sons, Inc., New York, 600pp
- Ovendem J (2000). Development and Restriction Enzyme Markers for Red Snapper (*Lutjanus erythropterus* and *Lutjanus fulviflamma*) and *Lutjanus fulviflamma* Aquaculture 173, 413–423.
- Primack, R. B. Supriatna, J. Indrawan, M. & Kramandibrata, P. 1998. *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associate, Sunderland, Massachusetts.
- Saputra, D. 2009. Gambaran (RFLP) Gen Sitokrom b DNA Mitokondria dari Sembilan Spesies Ikan Air Tawar. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Setiawan I.E, Rovara, O dan M.H Amarullah. 2007. Mengenal Sumberdaya Ikan Sidat. BPPT-HSF, Jakarta. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sartika, Tike, 2000. Studi Keragaman Fenotip dan Genetik Ayam Kampung pada populasi dasar seleksi. Thesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Setiawan I.E, Rovara, O dan M.H Amarullah. 2007. Mengenal Sumberdaya Ikan Sidat. BPPT-HSF, Jakarta. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor
- Teng, H.Y, Y.S. Lin, dan T.S. Tzeng. 2009. A New *Anguilla* Species and a Reanalysis of the Phylogeny of Freshwater Eels. Department of Life Science, National Tsing Hua University, Hsinchu 300, Taiwan. J. 48(6): 808-822
- Tesch, F.W. 1977. The eel biology and management of *anguilla* eels. Chapman and Hall. London 434 p.
- Watanabe, S, J. Aoyama, K. Tsukamoto. 2008. The Use of Morphological and molecular genetic variation in the genus *anguilla*. University of Tokyo. J. coastal marine Sci. 32 (3)
- Warwick, E.J., H.J. Astuti, M.J. and W. Hardjo Subroto, 1987. Pemuliaan. Ternak. Gajah Mada University Press. Jogjakarta
- genus *anguilla*. University of Tokyo. J. coastal marine Sci. 32 (3)
- Warwick, E.J., H.J. Astuti, M.J. and W. Hardjo Subroto, 1987. Pemuliaan. Ternak. Gajah Mada University Press. Jogjakarta