

**KEANEKARAGAMAN GENETIK BEBERAPA SPESIES
IKAN PELANGI IRIAN MELALUI MITOKONDRIA DNA (mt-DNA)
DENGAN TEKNIK PCR.**

Djamhuriyah S. Said^{*}, Odang Carman^{}, & Livia R. Tanjung^{*}**

ABSTRAK

Ikan pelangi Irian atau kelompok Rainbowfishes tersebar di Papua dan Australia, tergolong kedalam famili Melanotaeniidae yang memiliki enam genus dan terbagi dalam 53 spesies. Beberapa spesies hidup secara endemik di perairan danau atau sungai-sungai. Ikan pelangi memiliki keindahan bentuk dan warna sehingga memiliki nilai ekonomis sebagai ikan hias. Informasi genetik (gen/DNA) ikan- ikan tersebut masih jarang dilaporkan.. Penelitian genetik melalui mitokondria DNA (mt-DNA) dari lima jenis ikan pelangi Irian, yaitu Glossolepis incisus, Melanotaenia boesemani, M. lacustris, M. maccullochi dan M. praecox telah dilakukan pada bulan Februari—Maret 1999 di Laboratorium Genetik dan Reproduksi Ikan Fak Perikanan IPB. Kajian awal ini lebih ditekankan pada kesesuaian primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuens mt-DNA ikan pelangi. Penelitian dilakukan dengan menggunakan dua jenis primer yaitu F & R Primer [Takara] dan Universal Primer [Gibco] dan 1 jenis enzim restriksi Mbo I. Amplifikasi mt-DNA menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Primer F&R [Takara] memiliki sekuens yang sesuai dengan mtDNA (D-loop) tiga spesies ikan pelangi yaitu G. incisus, M. lacustris, dan M. praecox. Enzim restriksi Mbo I mempunyai masing-masing satu situs pemotongan pada mtDNA ketiga spesies tersebut.

Kata Kunci: ikan pelangi, kesesuaian, mtDNA, pcr, primer, sekuens.

ABSTRACT

GENETIC VARIATION OF SOME SPECIES RAINBOW FISH OF IRIAN THROUGH MITOCHONDRIAL DNA (mt-DNA) USED PCR TECHNIQUE. PRELIMINARY STUDY IN SUITABILITY OF PRIMER. *Rainbowfish belongs to family Melanotaeniidae has six genera and 53 species distributed in Irian Jaya, Papua New Guinea, and Australia. Several species are endemic in these locations. Attractive color and shape of the fish have the economical value as ornamental fish. On the other hand the genetic information (gene/DNA) of the fish is so poor. The information is needed such as for genetic conservation. The research of genetic variation of 5 species of Rainbowfish was conducted in Laboratory of Fish Breeding and Genetics, Faculty of Fisheries and Marine Science-IPB on February—March 1999. In this preliminary study more emphasized on suitability of primers F&R [Takara] and Universal primer [Gibco] to amplify mt-DNA sequence with PCR techniques. A restriction enzyme (Mbo I) was used to digest the mt-DNA sequence. The primer F&R [Takara] owning sequence matching with mt-DNA (D-Loop) of three species (Glossolepis incisus, Melanotaenia lacustris, and M. praecox). The restriction enzyme of Mbo I has each one situs of mt-DNA of the three species.*

Keyword: mtDNA, pcr, primer, rainbow fish sequence, suitability.

^{*} Staf Peneliti Puslit Limnologi-LIPI

^{**} Fak. Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor

PENDAHULUAN

Ikan pelangi atau *rainbowfish*, tergolong dalam famili Melanotaeniidae memiliki enam genus dengan 53 spesies, tersebar di daerah Irian Jaya, Papua New Guinea, dan Australia, beberapa jenis diantaranya hidup secara endemik (Allen, 1995). Berdasarkan informasi terakhir terdapat tujuh genus dengan 70 spesies (Henny, Univ. Indonesia, *kom prib.* 8 September 2004). Ikan pelangi bertubuh kecil (panjang maksimum 17 cm), memiliki warna yang menarik, ditemukan hidup berkelompok kebanyakan di habitat air bersih di bawah ketinggian 1500 meter, termasuk di sungai, danau dan rawa (Allen, 1995). Ukuran tubuh yang memadai dan warna yang menarik tersebut menjadikan ikan tersebut dikenal sebagai ikan hias yang memiliki nilai ekonomi penting.

Informasi tentang variasi morfologi dari famili Melanotaeniidae telah terungkap dengan jelas dan lengkap, namun informasi biologis khususnya secara molekuler (genetis) masih jarang dilaporkan. Informasi pada tingkat gen atau tingkat spesies tersebut sangat bermanfaat dalam usaha konservasi pada umumnya.

Pengungkapan informasi genetis diantaranya melalui penggunaan DNA mitokondria (*mitochondrial deoxiribo nucleic acid*; mt-DNA). Pada penggunaan mt-DNA dengan asumsi bahwa mt-DNA memiliki ciri pewarisan secara maternal, kecepatan mutasi relatif cepat, sehingga mudah untuk digunakan dalam mempelajari proses evolusi suatu spesies. Beberapa ciri lain dari mt-DNA yaitu berbentuk sirkuler, tidak berhiston, dan beruntai ganda. (Weaver & Hedrich, 1997). Pada “penangkapan” mt-DNA (segmen *D-loop*) digunakan bantuan suatu primer, yang mana segmen tersebut diamplifikasi dengan menggunakan teknologi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi suatu segmen DNA secara enzimatis, *in vitro*, dan dalam kurun

waktu yang relatif cepat dan singkat. Dalam hal ini digunakan enzim *Taq.* polimerase (Ausubel, 1995).

Pada penelitian ini dipelajari variasi genetik (mt-DNA) ikan pelangi melalui teknik PCR. Pada kajian awal lebih ditekankan pada kesesuaian primer yang digunakan untuk dapat mengamplifikasi sekuens mt-DNA beberapa spesies ikan pelangi Irian.

BAHAN DAN METODE

Waktu Penelitian dan Keterangan Ikan Contoh

Penelitian mt-DNA lima jenis ikan pelangi Irian telah dilakukan pada bulan Februari—Maret 1999 di Laboratorium Genetik dan Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Ikan contoh (jantan) diperoleh dari exportir ikan hias di daerah Cibinong.

Beberapa karakteristik ikan-ikan yang diteliti (Allen, 1995) adalah: 1) *Glossolepis incisus*, panjang total hingga 12 cm, individu jantan berwarna merah dan betina berwarna olive kecoklatan; 2) *Melanotaenia boesemani*, panjang total mencapai 12 cm, individu jantan berwarna jingga menyala pada arah ekor, dengan warna hijau kebiruan ke arah kepala dan betina berwarna kuning kehijauan; 3) *Melanotaenia lacustris*, panjang total mencapai 10 cm. Ikan jantan memiliki warna biru *turkeys* pada bagian dorsal dan warna putih pada bagian ventral tubuh, sedangkan ikan betina berwarna lebih pucat; 4) *Melanotaenia maccullochi*, panjang total ikan ini dapat mencapai 12 cm, warna tubuh putih mengkilap dengan beberapa garis coklat kehitaman memanjang disekujur tubuhnya. Siripnya berwarna jingga menyala sampai merah pada individu jantan dan kuning pada individu betina. 5) *Melanotaenia praecox*, ukuran tubuh relatif kecil sekitar 5—8 cm. Individu jantan dengan warna tubuh keperakan dan memantulkan warna biru,

sirip berwarna jingga menyala. Individu betina dengan warna tubuh yang sama dengan individu jantan, namun sirip berwarna kuning.

Metode

Cara kerja yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstraksi DNA total, pengecekan DNA, kloning mtDNA dengan PCR, dan pemotongan dengan enzim restriksi merujuk pada Ausubel (1995). Bahan dasar yang diperlukan dalam teknik PCR yaitu satu segmen DNA untai ganda (sebagai *template*), enzim DNA polimerase, dioksiribonukleotida (dNTP), primer, *buffer*, dan garam (Mg^{+}). Primer akan berhibridisasi dengan untai DNA komplemennya menurut arah $5' \rightarrow 3'$. Dalam satu kali sintesis akan dapat menghasilkan untai-untai DNA baru yang akan berhibridisasi dengan primer setelah proses denaturasi dan *annealing*. Pada teknik PCR dilakukan dengan menginkubasi contoh pada tiga ukuran suhu untuk mencapai tiga langkah yaitu denaturasi, *annealing* (penguatan), dan *extension* (perpanjangan) dalam penggandaan DNA.

Ekstraksi DNA Total

Masing-masing 50 mg contoh hati dari ikan hidup ditempatkan dalam tube 2 ml, digerus dan ditambah dengan 600 μ l cell lysis (*Cell & Tissue DNA Isolation Kit*) [Takara, Jepang]. Contoh diletakkan dalam wadah berisi batu es halus, kemudian masing-masing contoh ditambah 3 μ l Proteinase-K (20mg/ml), diaduk dengan menggunakan mikropipet, selanjutnya permukaan tube ditutupi parafilm. Contoh lalu diinkubasi dalam inkubator suhu $55^{\circ}C$ selama 1 jam (1—3 jam). Contoh ditambah 3 μ l RNase, dan diinkubasi kembali pada suhu $37^{\circ}C$ selama 30 menit. Kemudian contoh di-spin (*flash*) lalu didinginkan pada suhu ruangan. Selanjutnya contoh ditambah 200 μ l *Protein Precipitation Solution* [Takara, Jepang], dan dihomogenkan

dengan cara membolak-balikkan tube secara perlahan sebanyak 50 kali.

Contoh disentrifus selama tiga menit pada kecepatan 14.000 rpm, suhu $-4^{\circ}C$, sehingga terbentuk pellet dan supernatan. Supernatan dipindahkan ke tube baru ukuran 1,5 ml yang telah berisi 600 μ l isopropanol 100%. Contoh dihomogenkan dengan cara yang sama, dan disentrifus kembali selama satu menit dengan suhu dan kecepatan yang sama sampai terbentuk pellet DNA. Supernatan dibuang, pellet DNA dikeringkan dengan cara meletakkan tube yang tutupnya terbuka, pada tissue steril. Setelah itu contoh ditambah 600 μ l alkohol 70% (dingin) lalu disentrifus kembali selama satu menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, dan pellet DNA dikeringkan kembali dengan cara yang sama, atau dapat menggunakan aspirator. Pellet DNA yang telah terbebas dari larutan (kering) ditambah 100 μ l SDW (*Sterile Destilated Water*). Contoh DNA siap untuk dianalisis selanjutnya atau disimpan di freezer sebagai contoh DNA.

Pengecekan DNA

Untuk pengecekan DNA, dibuat gel agarose 1% yang dilarutkan dalam *buffer* 0,5 TBE. Agarose dilarutkan dengan cara dipanaskan, digoyang-goyangkan sampai mendidih dan terlihat bening. Gel yang terbentuk, (kira-kira pada suhu $55^{\circ}C$) dituangkan pada *tray gel* yang telah berisi *comb* (untuk pembuatan sumur-sumur gel), gel dibiarkan sampai beku, lalu *combnya* diangkat.

Tray dan gel dimasukkan ke dalam perlengkapan elektroforesis yang telah berisi *buffer* 0,5 TBE yang telah mengandung ethidium bromida sebagai pewarna. Permukaan gel harus tertutupi oleh *buffer*. Masing-masing contoh DNA diambil sebanyak 3 μ l dan ditambah 0,5 μ l *loading buffer*. Dihomogenkan dengan menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dengan

menggunakan mikropipet. Kemudian elektroforesis (*running*) dilakukan pada V:250 dan mA: 100 selama 1—2 jam. Hasil yang diperoleh diletakkan pada UV-transiluminator kemudian difoto dengan kamera digital.

Kloning mtDNA dengan PCR

Pada kloning DNA digunakan dua macam primer, yaitu F & R [Takara Jepang] dan Universal Primer [Gibco]. Pembuatan premix untuk ΣN contoh dilakukan dengan mencampur:

- 10 x buffer (μ l) 2,5 x ΣN x 1,1
- dNTP (μ l) 2,0 x ΣN x 1,1
- Ex-Taq (μ l) 2,5 x ΣN x 1,1
- Primer F (μ l) 2,0 x ΣN x 1,1
- Primer R (μ l) 2,0 x ΣN x 1,1

Untuk penggunaan Primer Universal, maka premix dibuat dengan menggunakan primer Universal. Kemudian pada tiap tube, dibuat total volume dengan penambahan contoh DNA dan SDW (*Sterile Destilat Water*). Selanjutnya contoh dimasukkan dalam PCR untuk amplifikasi dengan tiga ukuran suhu yaitu denaturasi 94°C; *anneuling* 62°C; & *elongation* 72°C. Pengerjaan dengan 30 siklus selama kira-kira 1,5 jam. Pengecekan hasil kloning/amplifikasi (menggunakan elektroforesis dengan agarose gel) sama dengan pada saat pengecekan DNA genom total.

Pemotongan dengan Enzim Restriksi

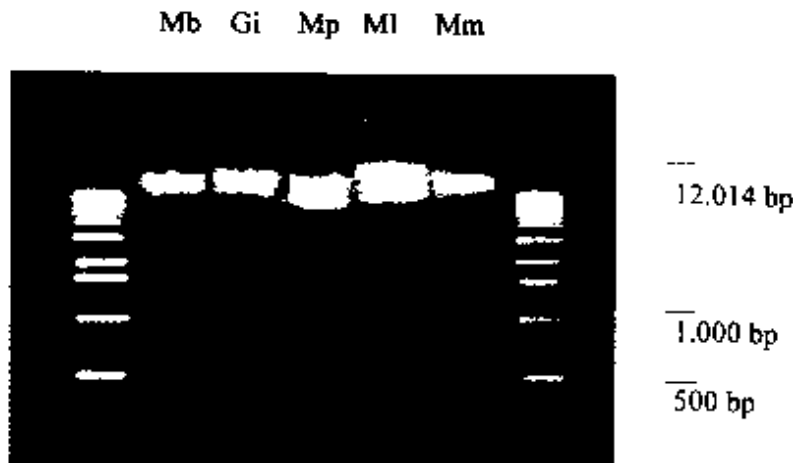
Contoh mt-DNA hasil amplifikasi dipotong (*digest*) dengan enzim *Mbo* I

[Takara] dengan cara membuat total volume 10 μ l yang mengandung: 7 μ l SDW/DDW; *buffer* 1 μ l; enzim *Mbo* I : 1 μ l ; dan contoh: 1 μ l. Contoh kemudian dihomogenkan dan di spin (*flash*) pada 5000 rpm (4°C), kemudian diinkubasi pada inkubator 37°C selama 2—3 jam. Hasil yang diperoleh dicek dengan cara dielektroforesis yang menggunakan agarose gel. Hasil elektroforesis kemudian difoto dengan kamera digital dalam penyinaran dengan lampu UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi DNA Total/Genom Ikan Pelangi

Hasil ekstraksi DNA genom kelima spesies ikan pelangi antara 14.000 – 16.000 bp (Tabel 1; Gambar 1). Perkiraan tersebut dengan standar pada marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] dengan ukuran maksimum 12014 bp. Jumlah DNA genom yang diperoleh relatif lebih rendah daripada DNA genom total ikan sidat *Anguilla bicolor* (Amarullah, *et al.* 199) dan ikan Mas (Faizal *et al.*, 1999) yang sama-sama melebihi 23 kb atau 23.000 bp. Meskipun DNA merupakan molekul yang stabil, namun mudah terdegradasi oleh enzim *cellular endonuclease* seperti DNA-ase. Beberapa jenis ikan tertentu mempunyai enzim tersebut yang dapat menghambat pada proses ekstraksi DNA (Asahida *et al.*, 1996 *dalam* Amarullah, 1999). Dari hasil yang diperoleh diduga bahwa ikan pelangi tergolong ikan yang memiliki enzim *cellular endonuclease*.



Marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] uk. Max. 12014 bp
 Gambar 1. Hasil ekstraksi DNA genom ikan pelangi

Tabel 1. DNA genom lima spesies ikan pelangi

NO.	SPESES	DNA GENOM
1.	<i>G incisus</i> /Gi	± 15.000 bp
2.	<i>M.boesemani</i> /Mb	± 14.000 bp
3.	<i>M.lacustris</i> /Ml	± 16.000 bp
4.	<i>M. macculochi</i> /Mm	± 14.000 bp
5.	<i>M. praecox</i> /Mp	± 14.000 bp

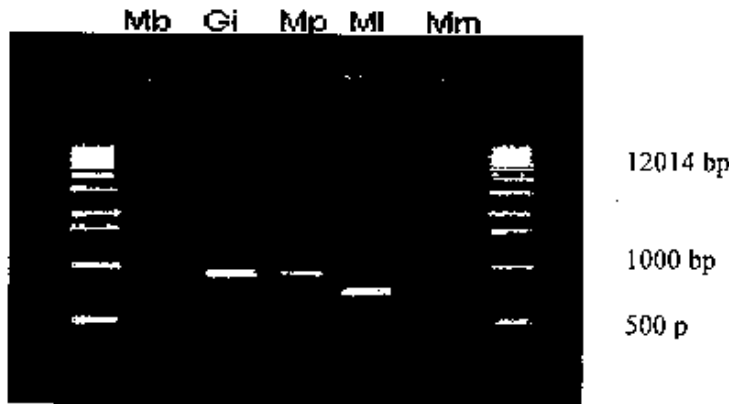
Marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] uk. Max. 12014 bp

Tampaknya hasil ekstraksi DNA genom cukup baik, namun pada contoh *M. lacustris* dan *M. praecox* terlihat kurang utuh. Hal tersebut diduga disebabkan oleh kesalahan pada saat penggerusan hati sebagai contoh. Kesalahan dalam penanganan contoh akan dapat menghasilkan gambaran DNA yang kurang sempurna (McPherson, 1992).

Konsentrasi mt-DNA (*D-loop*)

Teknik PCR pada amplifikasi fragmen mt-DNA (*D-loop*) yang memberikan hasil yaitu dengan primer F&R [Takara] (Gambar 2).. Sedangkan yang menggunakan primer Universal [Gibco] tidak memberikan hasil. Hal tersebut diduga disebabkan oleh beberapa hal seperti primer

yang digunakan (Primer Universal) tidak memiliki sekuens yang cocok dengan sekuens mt-DNA kelima spesies ikan pelangi tersebut, atau juga titik *melting* primer tidak sesuai dengan suhu yang digunakan pada proses amplifikasi. Selain itu diduga pula terjadinya kesalahan teknis penanganan primer misalnya dalam teknik penyimpanan atau saat pengambilan primer ketika akan digunakan. Penelitian kesesuaian jenis primer yang dilakukan oleh Astuti *et al.* (1998) terhadap burung kakatua Tanimbar dengan menggunakan ciri “RPAD” menemukan bahwa dari 20 primer yang diujicobakan hanya 14 primer yang dapat berfungsi dalam ‘penangkapan’ sekuens DNA burung tersebut. Penelitian polimorfik atau keanekaragaman gen suatu spesies sebaiknya didahului oleh penelitian *sequencing* DNA, untuk mendapatkan sekuens-sekuens DNA, sehingga dapat ditentukan jenis primer yang akan digunakan dalam proses amplifikasi (Handoko, 1998. Biologi Univ. Indonesia, *kom. pribadi* November 1998). Akan tetapi primer universal dapat bekerja dengan baik dalam mengamplifikasi mt-DNA beberapa strain udang windu (Moria *et al.*, 2004).



Marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] uk. Max. 12014 bp
 Gambar 2. Hasil kloning mt-DNA dengan PCR

Mitokondria DNA hasil amplifikasi memiliki panjang antara 800—900 bp untuk spesies *G. incisus*, *M. praecox*, dan *M. lacustris* (Gambar 3; Tabel 2). Hasil penelitian pada ikan *Pangasius* juga memberikan gambaran yang serupa. (Carman, 1999. *tidak dipublikasikan*). Dalam hal ini terdapat kemungkinan bahwa panjang *D-loop* ikan umumnya antara 800-900 bp. Pada spesies *M. boesemani* dan *M. macculochi* tidak terlihat adanya fragmen DNA. Hal tersebut diduga karena kurang bersihnya DNA dari protein ataupun pengganggu lain pada saat ekstraksi, sehingga proses amplifikasi tidak berjalan sempurna atau primer tidak dapat mengenali komplemennya (Mc Pherson *et al*, 1992) karena umumnya pada jenis ikan yang *sekelompok* memiliki sekuens yang relatif sama.

Tabel 2. Mitokondria DNA 5 spesies ikan pelangi

NO.	SPESES	Mt-DNA
1.	<i>G incisus</i> /Gi	± 900 bp
2.	<i>M.boesemani</i> /Mb	-
3.	<i>M.lacustris</i> /Ml	± 800 bp
4.	<i>M. macculochi</i> /Mm	-
5.	<i>M. praecox</i> /Mp	± 900 bp

Marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] uk. Max. 12014 bp

Pita mtDNA *M. praecox* terlihat sangat tipis (Gambar 2) . Penyebabnya diduga serupa dengan tidak munculnya pita mt-DNA ikan *M. boesemani* dan *M. macculochi*. Hal lain yang diduga mempengaruhi hal tersebut bahwa jumlah siklus 30 belum cukup untuk *M. praecox* sehingga perlu diperbanyak agar DNA yang teramplifikasi relatif lebih banyak dan pita DNA akan terlihat lebih tebal. Setiap siklus dalam proses amplifikasi DNA terdiri dari tiga tahap. Satu siklus amplifikasi akan menghasilkan dua fragmen DNA baru. Pada siklus amplifikasi berikutnya kedua fragmen DNA tersebut akan berfungsi sebagai *template* sehingga untuk n siklus amplifikasi akan didapatkan 2ⁿ fragmen DNA. Makin banyak siklus yang digunakan akan menghasilkan fragmen DNA lebih banyak (Mc Pherson *et al*, 1992)

Mitokondria DNA Hasil Pemotongan (*Digest*)

Enzim yang digunakan dalam pemotongan (*digest*) DNA hanya satu jenis yaitu *Mbo* I. Menurut Weaver & Hedrick (1997) bahwa enzim tersebut akan memotong fragmen DNA pada situs ↓GATC
CTAG↑

Enzim *Mbo* I memiliki satu situs pemotongan pada ikan pelangi (Gambar 3). Hal tersebut tampak dengan munculnya dua pita pada mt-DNA *M. lacustris* pada panjang kira-kira 600 dan 200 bp. Apabila situs pemotongan lebih dari satu maka akan terlihat lebih dari dua pita DNA. Pada gambar 3 tersebut terlihat pula bahwa contoh DNA ikan *G. incisus* terpotong menjadi dua dengan panjang kira-kira 800 bp dan 100 bp. Akan tetapi yang tervisualisasi hanya satu pita (800 bp). Dalam hal ini diduga pita dengan panjang 100 bp terlepas dari gel saat elektroforesis, karena ukuran yang kecil akan mudah bergerak lebih cepat dan lebih jauh. Masalah tersebut mungkin dapat diatasi dengan penggunaan gel yang lebih kental (2%) atau ukuran gel yang lebih panjang. Gel yang lebih kental akan dapat menahan laju fragmen DNA pada proses elektroforesis. Pada penelitian ini digunakan gel agarose 1%.

sangat sedikit dibandingkan lainnya (*lih.* Gambar 1). Tidak terdapatnya potongan fragmen DNA ikan tersebut diduga bukan menunjukkan tidak adanya situs pemotongan oleh enzim *Mbo* I, karena apabila tidak terdapat situs pemotongan maka akan tampak DNA awal yang utuh dengan panjang kira-kira 900 bp, seperti yang terjadi pada penelitian DNA udang windu yang tidak mengalami pemotongan oleh enzim yang sama (Moria *et al.*, 2004).

Penelitian yang dilakukan belum memberikan hasil yang memuaskan karena hanya menggunakan dua primer dan satu jenis enzim restriksi. Untuk mempelajari polimorfik DNA sebaiknya digunakan beberapa macam enzim restriksi yang lebih bervariasi sehingga dapat dibandingkan kesamaan ataupun perbedaan fragmen DNA yang dimunculkan. Penelitian akan lebih baik apabila diawali dengan penelitian *sequencing* sehingga dapat ditentukan jenis primer yang sesuai dengan *templatenya*.



Marker 1 kb ladder [Takara, Jepang] uk. Max. 12014 bp

Gambar 3. Hasil pemotongan mt-DNA dengan enzim restriksi *Mbo* I

Pada contoh *M. praecox* tidak terlihat pita DNA-nya (Gambar 3). Diduga DNA ikan tersebut sangat sedikit sehingga proses *digest* tidak berlangsung dengan sempurna. Jumlah DNA ikan *M. praecox*

KESIMPULAN

Primer F&R [Takara] memiliki sekuens yang sesuai dengan mt-DNA (D-loop) 3 spesies ikan pelangi yaitu

Glossolepis incisus, *Melanotaenia lacustris*, dan *M. praecox*. Enzim restriksi *Mbo* I mempunyai masing-masing satu situs pemotongan pada mt-DNA ketiga spesies tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan pada proyek Penelitian, Pengembangan, dan Pendayagunaan Biota Darat 1998/1999 yang telah membiayai penelitian ini, Kepala Lab. Genetika dan Reproduksi Ikan, Fak.Perikanan & Ilmu Kelautan, IPB, Ir. Alimuddin, Dik Yuli, Dik Lina, dan Dik Hidayat yang telah membantu.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, G. R, 1995. Rainbowfishes in Nature and in the Aquarium. Tetra-Verlag. Tetra Werke Dr.rer.nat. Ulrich Baensch GmbH. Herrenteich 78. Germany.
- Amarullah, M. H., I. Faizal, & I. T. Makagiansar, 1999. Aplikasi Teknik RAPD untuk Identifikasi Polimorfisme DNA pada Elver Ikan Sidat, *Anguilla bicolor*. *Prosiding. Seminar Hasil Penelitian Genetika Ikan. Infigrad-Puslitbang Perikanan Dirjend Perikan Dep. Pertanian*. Hal. 45—49.
- Astuti, D., S. T. Priyono, H. Julistiono & D. Daryadi, 1998. Kajian Keanekaragaman Genetik Burung Kakatua Tanimbar (*Cacatua gaffini*, Finch) menggunakan penciri “FAPD”. *Berita Biologi* 4 (2): 60—65.
- Faizal, I., D. Irawan, R. S. Aliah, I. T. Makagiansar & M. H. Amarullah, 1999. Studi Pendahuluan Pengamatan Polimorfisme DNA Ikan Mas menggunakan Teknik RAPD-PCR. *Prosiding. Seminar Hasil Penelitian Genetika Ikan. Infigrad-Puslitbang Perikanan Dirjend Perikan Dep. Pertanian*. Hal. 40—44.
- Ausubel, 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. Third ed. John Wiley & Son.USA.
- Mc Pherson, M. J., P.Quirke, & G. R.Taylor, 1992. PCR. A Practical Approach. The Practical Approach Series. Oxford University Press. Oxford; 253 hal.
- Moria, S. B., I. G. N. Permana, & Haryanti. 2004, Mt-DNA Analisis of Seeds from Different Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Broodstock Sources. *Aquaculture Indonesia* 4 (1): 19—27.
- Weaver, R. F. & Ph. W. Hedrick, 1997. *Genetics*. Third ed. Wm.C. Brown Publishers Dubuque 1A: 638 hal.