

Keanekaragaman Genetik Kerang Totok (*Polymesoda Erosa*) Di Sungai Donan Cilacap Berdasarkan Penanda RAPD

Pangeran Andareas

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Prima Indonesia, Jl. Raya Babelan KM.96, Bekasi

Surel: pangeranandareas@gmail.com

Abstrak

Kerang totok (*Polymesoda erosa*) merupakan salah satu jenis kerang yang dimanfaatkan sebagai sumber makanan yang penting oleh masyarakat di sekitar pantai, termasuk di Sungai Donan Cilacap. Namun, habitat kerang totok mengalami pengurangan akibat overeksploitasi, pencemaran perairan dan sebagainya sehingga perlu adanya upaya pelestarian. Hal tersebut mendorong perlu dilakukannya penelitian tentang keanekaragaman genetik kerang totok. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan primer yang menghasilkan marka RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) yang konsisten, memiliki pita polimorfik, dan mendapatkan informasi tentang keanekaragaman genetik kerang totok di Sungai Donan Cilacap. Penelitian ini menggunakan metode survei dengan teknik pengambilan sampel secara *incidental sampling*. Data yang diamati mencakup karakter molekuler berupa marka RAPD yang diamplifikasi menggunakan 10 primer acak. Genom total diisolasi dari jaringan otot 17 individu kerang totok. Amplifikasi marka RAPD dilakukan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Metode analisis dilakukan secara statistik menggunakan AMOVA (*Analysis of Molecular Variances*) berdasarkan ada tidaknya pita DNA spesifik pada gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa delapan dari sepuluh primer terseleksi mampu mengamplifikasi marka RAPD serta menghasilkan pita polimorfik. Kedelapan primer tersebut adalah GEN-11, GEN-13, GEN-14, GEN-15, GEN-16, GEN-20, GEN-23, dan GEN-24. Analisis keanekaragaman genetik menunjukkan bahwa 25 marka RAPD yang dapat diamplifikasi menggunakan kedelapan primer tersebut memiliki nilai polimorfisme sangat tinggi, yaitu sebesar 100%. Besarnya nilai keanekaragaman genetik yang diperoleh adalah $1,000 \pm 0,0202$.

Kata kunci : RAPD, *Polymesoda erosa*, Sungai Donan Cilacap, Keanekaragaman genetik.

Abstract

Mudclam (Polymesoda erosa) is one of shellfish commonly utilized by coastal people, including those in River Donan Cilacap, as important foodstuff. Its habitat, however, is now subjected to reduction due to overexploitation, water pollution etc., so that any attempt of conservation is required. This leads to the importance of studying the genetic diversity of the mudclam population. A study to obtain primers which can produce RAPD markers consistently and polymorphic bands and also to obtain information on genetic diversity of mudclam population in

River Donan Cilacap was conducted. Survey method with incidental sampling technique was applied. Data examined were RAPD markers amplified using 10 random primers. Total genomic DNA was isolated from muscle tissues of 17 individuals. Amplification of RAPD markers was performed employing PCR technique. Statistical analysis was carried out using AMOVA based on the presence of specific DNA bands on agarose gel. The results showed that eight of ten selected primers amplified RAPD markers and produced polymorphic bands. They are GEN-11, GEN-13, GEN-14, GEN-15, GEN-16, GEN-20, GEN-23, and GEN-24. Analysis on genetic diversity revealed that 25 RAPD markers amplified using the eight primers have a very high polymorphism value, i.e. 100%. The level of genetic diversity obtained was 1.000 ± 0.0202 .

Keywords: RAPD, Polymesoda erosa, River Donan Cilacap, Genetic Diversity.

1. Pendahuluan

Kerang totok (*Polymesoda erosa*) merupakan salah satu jenis kerang yang terdapat di perairan laut Indonesia. Kerang totok mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai sumber komoditas yang dapat menambah penghasilan bagi nelayan karena kerang jenis ini dapat dikonsumsi dan mengandung protein hewani cukup tinggi (Gimin et al., 2004). Menurut Dudley et al. (2000) kerang totok hidup di lingkungan yang berlumpur.

Populasi kerang totok di Sungai Donan Cilacap saat ini diduga mengalami gangguan akibat laju eksploitasi yang cukup intensif. Selain itu, kondisi perairan Sungai Donan diduga mengalami pencemaran yang cukup serius karena sungai ini merupakan tempat pembuangan limbah pengilangan minyak dan pabrik semen, yang hampir setiap hari membuang limbahnya ke sungai tersebut. Sungai Donan juga digunakan sebagai alur pelayaran baik antardesa maupun wisata bahari (Dinas Hidro-Oseanografi TNI AL, 2002).

Overeksploitasi dan pencemaran perairan Sungai Donan berpotensi mengancam kelestarian dan keanekaragaman genetik populasi kerang totok. Menurut Ledig (1992) dan Hauser et al. (2002) Overeksploitasi dapat menyebabkan hilangnya atau menurunnya keanekaragaman genetik suatu populasi. Penurunan keanekaragaman genetik selanjutnya dapat berakibat pada menurunnya kemampuan adaptasi, ketahanan populasi, dan produktivitas (Hauser et al., 2002).

Studi keanekaragaman genetik pada suatu populasi organisme dimaksudkan untuk memberikan evaluasi mengenai keanekaragaman genetik yang terjadi pada populasi tersebut. Menurut Suryadi (2002), studi tentang keanekaragaman genetik merupakan aspek yang sangat penting dalam pelestarian. Hal tersebut karena keanekaragaman genetik sangat dibutuhkan oleh setiap spesies untuk menjaga kemampuannya dalam berkembang biak dan beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan (Fe'ral, 2002), termasuk ketahanannya terhadap berbagai macam penyakit. Dengan perkataan lain, spesies membutuhkan cadangan genetik yang bervariasi agar senantiasa mampu bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang sewaktu-waktu dapat berubah. Di samping itu, data keanekaragaman genetik sangat penting dalam menunjang upaya pemanfaatan plasma nutfah. Indriani et al. (2002), menyatakan bahwa makin tinggi keanekaragaman genetik plasma nutfah, makin besar peluang untuk memperoleh organisme dengan sifat yang diinginkan.

Salah satu marka DNA yang dapat digunakan untuk analisis keanekaragaman genetik populasi adalah Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Penanda molekuler RAPD dihasilkan melalui proses amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan teknik polymerase chain reaction (PCR)

yang dikembangkan oleh Williams et al. (1990). Menurut Demeke dan Adams (1994), prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat, membutuhkan sampel DNA lebih rendah (0,550 ng) dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya bila dibandingkan dengan RFLP. Walaupun metode ini kurang sempurna dan memiliki kelemahan dalam konsistensi produk amplifikasi (Jones et al., 1997), kelemahan ini dapat diatasi dengan mengoptimalkan ekstraksi DNA, kondisi PCR, serta pemilihan primer yang tepat. Sebagai contoh, marka RAPD telah digunakan dalam penelitian mengenai hubungan genetik lobster (Aranisi dan Okimoto, 2004), perbedaan genetik bivalvia Abra tenuis (Holmes et al., 2004), keanekaragaman genetik kerang zebra dan kerang quagga (Stepien et al., 2002) dan identifikasi spesies (Rego et al., 2002).

2. Metode Penelitian

2.1 Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode survey dengan teknik pengambilan sampel secara *incidental sampling*.

2.2 Pengumpulan Plasma Nutfah

Sampel jaringan diambil dari jaringan otot kerang totok dengan ukuran kurang 5 mm. sampel jaringan selanjutnya diawetkan dalam alcohol 96% dan kemudian disimpan pada suhu ruang hingga analisis DNA dilakukan.

2.3 Isolasi dan Amplifikasi Marka RAPD

DNA genom diisolasi menggunakan metode Chelex (Walsh *et al.*, 1991). Marka RAPD diamplifikasi menggunakan primer acak sebagai berikut :

GEN11	(5'-TGCGCGATCG-3'),
GEN112	(5'-CAGGGTCGAC-3'),
GEN113	(5'-ACGGTGCCTG-3'),
GEN114	(5'-CGCATTCCGC-3'),
GEN115	(5'-GAGATCCGCG-3'),
GEN116	(5'-GGACTCCACG-3'),
GEN117	(5'-ATCTCCCGGG-3'),
GEN120	(5'-CAGACACGGC-3'),
GEN123	(5'-GTGTAGGGCG-3'),
GEN124	(5'-CGGGTCGATC-3')

(Aranisi dan Okimoto, 2004)

Reaksi PCR dilakukan dengan volume total 25 μ L, dengan campuran reaksi PCR terdiri atas 0,2 μ L Taq DNA Polimerase, 2,5 μ L PCR reaction buffer 10x, 1,5 μ L dNTPs (5 mM), 1,5 μ L masing-masing primer (1 mM), 3 μ L DNA Template dan aquades sampai dengan volume akhir 25 μ L.

Siklus termal meliputi fase denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 3 menit, diikuti 44 siklus fase denaturasi pada suhu 94 °C selama 10 menit, fase penempelan primer (annealing) pada suhu 40 °C selama 10 detik, dan fase pemanjangan (elongation) pada suhu 72 °C selama 1,5 menit, dilanjutkan dengan proses pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Produk PCR selanjutnya divisualisasikan pada elektroforesis gel agarosa 1,2%.

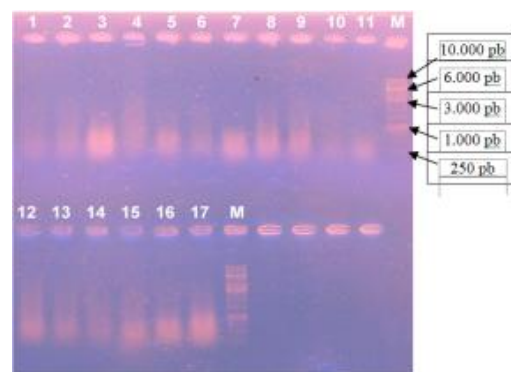
2.4 Metode Analisis

Penentuan primer terseleksi dilakukan secara deskriptif berdasarkan kemunculan pita marka RAPD yang konsisten dan polimorfik. Besarnya keanekaragaman genetik dianalisis secara statistik menggunakan AMOVA. Perhitungan tersebut dilakukan dengan bantuan software Arlequin ver 2.0 (Schneider et al., 2000). Sebelum diaplikasikan ke Software, pola marka RAPD yang tervisualisasi pada gel agarosa diubah menjadi data biner (0 : 1, 0 berarti fragmen tidak muncul dan 1 berarti fragmen muncul).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA genom total dari 17 sampel kerang totok dapat dilihat pada gambar 1. Visualisasi DNA genom total pada gel agarosa memperlihatkan pita DNA berupa smear. Hal ini menunjukkan bahwa DNA tersebut diduga mengalami fragmentasi fisik selama proses isolasi. Menurut Pharmawati (2009), smear pada DNA umumnya disebabkan oleh fragmentasi DNA akibat perlakuan fisik. Namun, dari intensitas ketajaman pita yang terlihat, DNA hasil isolasi tersebut masih dapat digunakan sebagai template PCR untuk menghasilkan marka RAPD yang diharapkan.



Gambar 1. Hasil Isolasi DNA dari Jaringan Otot *Polymesoda erosa*.

Keterangan : No. 1-17: nomor individu, M: DNA Ladder.

3.2 Hasil Amplifikasi Marka RAPD

Hasil amplifikasi marka RAPD yang terbaik diperoleh pada kondisi PCR sebagai berikut; 94 °C selama 3 menit untuk predenaturasi, diikuti 44 siklus yang masing-masing terdiri atas denaturasi pada suhu 94 °C selama 10 detik, annealing pada suhu 38 °C selama 10 detik, fase pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1,5 menit, dilanjutkan dengan proses pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

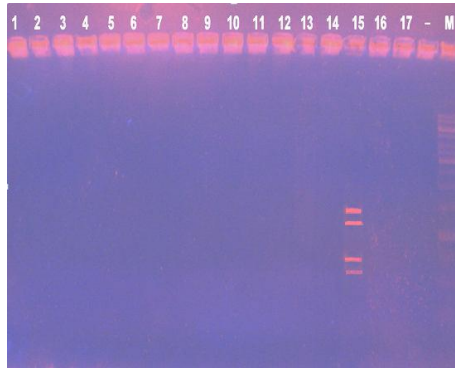
Selain optimalisasi kondisi PCR, pada penelitian ini juga dilakukan seleksi primer. Primer yang digunakan sebanyak 10 buah. Hasil seleksi menunjukkan bahwa delapan dari sepuluh primer yang digunakan dapat menghasilkan pita RAPD, sementara dua primer sisanya tidak dapat mengamplifikasi marka RAPD dari jaringan otot kerang *P. erosa*. Delapan primer yang dapat mengamplifikasi marka RAPD adalah GEN 11, GEN 13, GEN 14, GEN 15, GEN 16, GEN 20, GEN 23, dan GEN 24. Sementara itu, dua primer yang tidak dapat mengamplifikasi marka RAPD adalah GEN 12 dan GEN 17.

Tidak teramplifikasinya DNA oleh suatu primer diduga disebabkan oleh beberapa factor, antara lain tidak adanya situs homolog antara primer tersebut dengan DNA templat dari suatu organisme, serta menempelnya primer acak yang digunakan pada dua situs DNA cetakan yang jaraknya cukup jauh sehingga enzim Taq DNA Polimerase tidak mampu mengamplifikasinya (Yuwono, 2006).

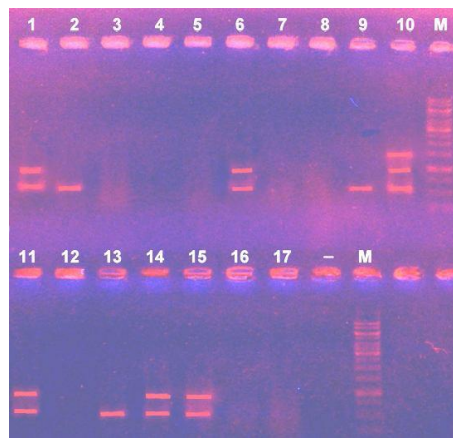
Menurut Hallden et al (1994), jumlah primer yang diperlukan dalam analisis RAPD sangat bergantung kepada tujuan atau jenis informasi yang diinginkan. Semakin banyak primer yang digunakan, maka rendah nilai koefisien keanekaragaman hasil analisis yang diperoleh. Sepuluh sampai dengan dua puluh primer dianggap telah mencukupi untuk keperluan analisis keanekaragaman dan kekerabatan karena dengan sepuluh primer pengaruh kesalahan percobaan telah diperkecil hingga mendekati nol.

Amplifikasi marka RAPD dari jaringan otot kerang *P. erosa* menggunakan delapan primer terseleksi menghasilkan marka RAPD sebanyak 25 buah. Marka RAPD yang diperoleh ini memiliki ukuran mulai dari 67 hingga 1.500 pasang basa (pb).

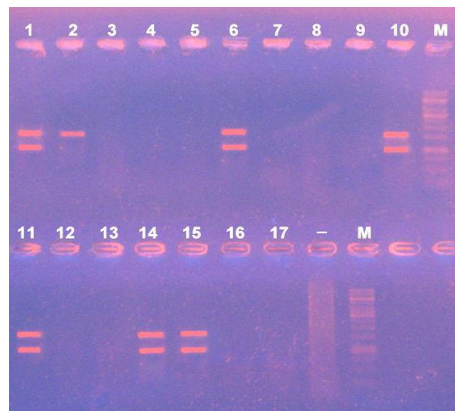
Amplifikasi menggunakan primer GEN 11 menghasilkan marka RAPD sebanyak empat buah. Ukuran marka RAPD yang diperoleh menggunakan primer tersebut berkisar dari 625 pb sampai dengan 1.500 pb. Primer GEN13 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak tiga buah, berukuran 500 pb, 1000 pb, dan 1.500 pb. Primer GEN 15 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak dua buah dengan ukuran 1.046 pb dan 1500 pb. Primer GEN 16 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak tiga buah, berukuran 750 pb, 1.041 pb, dan 1.500 pb. Primer GEN 20 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak lima buah. Berukuran 267 pb sampai dengan 1.085 pb. Primer GEN 23 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak tiga buah, berukuran 291 pb, 500 pb. Primer GEN 24 mampu mengamplifikasi marka RAPD sebanyak tiga buah, berukuran 750 pb, 1.000 pb, dan 1.250 pb.



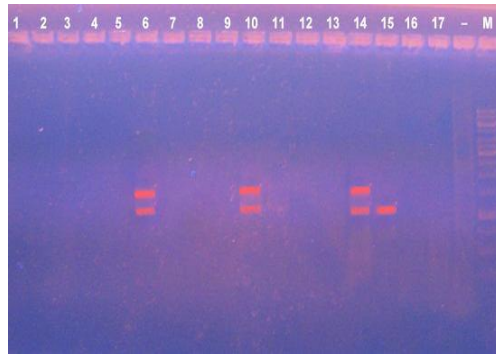
A



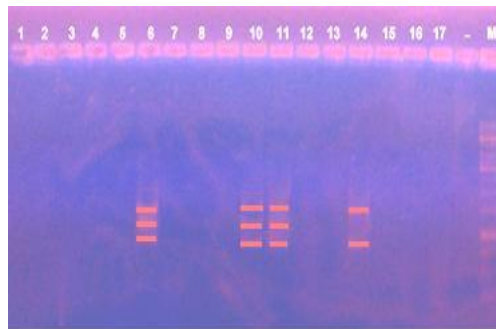
B



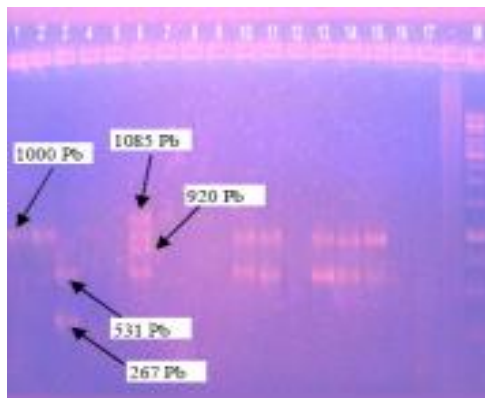
C



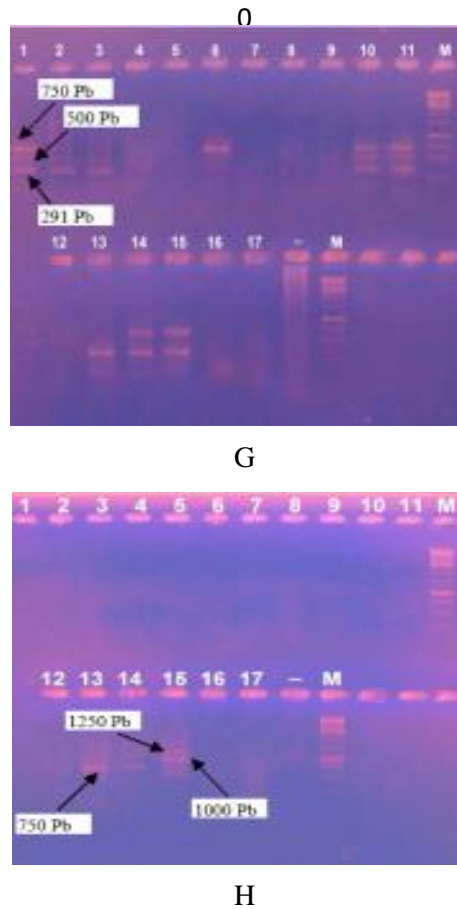
D



E



F



Gambar 2. Pola Pita Marka RAPD Hasil Amplifikasi Menggunakan Delapan Primer yang Berbeda.

Keterangan: (A: GEN 11, B: GEN 13, C: GEN 14, D: GEN 15, E: GEN 16, F: GEN 20, G: GEN 23, H: GEN 24, No. 1-17: nomor individu, M: DNA ladder).

Kedelapan primer terseleksi tidak dapat mengamplifikasi marka RAPD pada ketujuh belas individu *P. erosa* yang digunakan dalam penelitian ini. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 11 hanya muncul pada individu nomor 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 13 hanya muncul pada individu nomor 1, 2, 6, 10, 11, 13, 14, dan 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 14 hanya muncul pada individu nomor 1, 2, 6, 10, 11, 14, dan 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 15 hanya muncul pada individu nomor 6, 10, 14, dan 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 16 hanya muncul pada individu nomor 6, 10, 11, dan 14. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 20 hanya muncul pada individu nomor 1, 2, 3, 6, 10, 11, 13, 14, dan 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 23 hanya muncul pada individu nomor 1, 2, 3, 6, 10, 11, 13, 14, dan 15. Marka RAPD hasil amplifikasi menggunakan primer GEN 24 hanya muncul pada individu nomor 13, 14, dan 15.

3.3 Polimorfisme Marka RAPD

Tabel 1. Primer Terpilih dan Polimorfisme Marka RAPD Teramplifikasi yang Digunakan untuk Analisis Keanekaragaman Genetik *P. erosa* di Sungai Donan Cilacap.

Primer	Jumlah Marka Teramplifikasi	Jumlah Pita per Individu	Jumlah Marka Monomorfik	Jumlah Marka Polimorfik	Polimorfisme (%)
GEN-11	4	0-4	0	4	100
GEN-13	3	0-3	0	3	100
GEN-14	2	0-2	0	2	100
GEN-15	2	0-2	0	2	100
GEN-16	3	0-3	0	3	100
GEN-20	5	0-4	0	5	100
GEN-23	3	0-3	0	3	100
GEN-24	3	0-2	0	3	100
Total	25		0	25	100

Variasi kemunculan fragmen pada individu yang dianalisis menggunakan delapan primer terpilih memperlihatkan adanya polimorfisme pita DNA. Menurut solihin (2006), polimorfisme diperoleh dari ada tidaknya pita-pita DNA pada sampel hasil amplifikasi dengan primer tertentu. Polimorfisme merupakan gambaran perbedaan fragmen DNA yang di observasi akibat adanya perbedaan sekuens sehingga menunjukkan adanya keanekaragaman. Terjadinya polimorfisme pita DNA disebabkan oleh adanya perbedaan posisi penempelan primer pada untai DNA genom atau perbedaan sekuens antara satu individu dan individu lainnya. Polimorfisme juga disebabkan oleh terjadinya substitusi, delesi, dan insersi pada situs penempelan primer. Dengan demikian, primer kehilangan sisi pengenalannya sehingga sulit atau tidak dapat di amplifikasi. Polimorfisme dapat dijadikan acuan untuk menelusuri keanekaragaman suatu organisme (Salam, 1994)

3.4 Keanekaragaman Genetik

Keanekaragaman genetik antara lain ditentukan oleh nilai rata-rata heterozigositas dan persentase pita polimorfik (Asih et al., 2006). Marka RAPD yang dihasilkan dapat digunakan sebagai alat yang cukup baik dalam analisis struktur genetik populasi *P. erosa* dari Sungai Donan Cilacap karena pola pita yang dihasilkan memperlihatkan adanya polimorfisme. Analisis keragaman genetik pada penelitian ini menunjukkan bahwa 25 marka RAPD yang digunakan memiliki polimorfisme sangat tinggi, yaitu sebesar 100%. Hal serupa juga terjadi pada populasi kerang totok di Segera Anakan Cilacap dengan nilai polimorfisme sebesar 100% menggunakan penanda RAPD (Nuryanto dan Susanto, 2010). Nilai polimorfisme yang sangat tinggi juga terjadi pada populasi *Trichogrammatoidea armigera*, parasitoid telur *Helicoverpa armigera* yaitu sebesar 98,11% dengan menggunakan penanda RAPD (Bahagiawati et al., 2006).

Populasi kerang *P. erosa* di Sungai Donan Cilacap memiliki keanekaragaman genetik yang tinggi. Menurut Thaewan et al (2004), faktor utama yang mempengaruhi nilai keanekaragaman genetik, yaitu cara bereproduksi seksual atau aseksual dan ukuran populasi.

Dari sisi budaya dan konservasi, tingginya nilai keanekaragaman genetik yang diperoleh pada populasi kerang *P. erosa* dalam penelitian ini, sangat menguntungkan. Hal tersebut karena

keanekaragaman genetik terkait langsung dengan adaptasi, ketahanan terhadap penyakit, seleksi, dan produktivitas. Keanekaragaman genetik suatu populasi akan mempengaruhi respon populasi tersebut terhadap seleksi, baik seleksi buatan maupun seleksi alam (Imron, 1997). Rina (2002), menambahkan bahwa populasi dengan tingkat keanekaragaman genetik yang tinggi mempunyai peluang hidup yang lebih baik karena mempunyai kemampuan yang lebih baik untuk beradaptasi dengan lingkungannya. Menurut O'Brien (1994), tingkat keanekaragaman genetik dapat dijadikan sebagai indikator potensi adaptasi terkait dengan perubahan lingkungan. Oleh karena itu, diharapkan bahwa nilai keanekaragaman genetik yang tinggi dalam penelitian ini dapat dijadikan indikator tingginya kemampuan adaptasi populasi kerang *P. erosa* dari Sungai Donan Cilacap terhadap kondisi lingkungan. Keanekaragaman genetik yang tinggi akan meningkatkan ketahanan populasi (Hughes dan Stachowicz, 2004; Tarpy, 2003). Sebaliknya, hilangnya atau turunnya keanekaragaman genetik memiliki efek merugikan pada population fitness (Reed dan Frankham, 2003).

Namun, tingginya laju eksploitasi terhadap populasi kerang *P. erosa* di Sungai Donan Cilacap perlu mendapatkan perhatian serius karena pada waktu tertentu keanekaragaman genetiknya dapat menurun sebagai dampak overeksploitasi yang berkepanjangan. Kondisi tersebut selanjutnya dapat membahayakan kelestarian populasi kerang *P. erosa* di masa datang. Menurut Ledig (1992) dan Hauser et al. (2002), overeksploitasi telah mengakibatkan keanekaragaman genetik satu populasi menurun dengan tajam. Lebih lanjut dinyatakan bahwa keanekaragaman genetik yang rendah dapat menyebabkan menurunnya kemampuan adaptasi, ketahanan populasi, dan kemampuan reproduksi.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa delapan dari sepuluh primer terseleksi mampu mengamplifikasi marka RAPD yang konsisten dan menghasilkan pita polimorfik. Dengan demikian, populasi kerang *Polymesoda erosa* di Sungai Donan Cilacap memiliki keanekaragaman genetik yang tinggi.

Daftar Pustaka

- Aranishi, F. and T. Okimoto. 2004. Genetic relationship between cultured populations of Pacific oyster revealed by RAPD analysis. *Journal of Applification Genetic* 45 (4): 435-443
- Asih, S. E., Nugroho, dan Mulyasari. 2006. Penentuan Variasi Genetik Ikan Batak (Tor sorro) dari Sumatera Utara dengan Metode Analisis Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Kumpulan Hasil Riset Tahun 2006*. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar. Hal: 1-9.
- Demeke, T. and R.P. Adams. 1994. The Use of PCR-RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution. p. 179-1 91. In H.G. Griffin and A.M. Griffin (Ed.). *PCR Technology Current Innovations*. CRC Press Inc., London.
- Dinas Hidro-Oseanografi TNI AL. 2002. *Alur Pelayaran Cilacap Jawa Pantai Selatan*. Tentara Nasional Indonesia-Angkatan Laut, Jakarta.
- Dudley, R. G, T. Nurhayati, H. Pamungkas, dan T. Nurcahyo. 2000. *Segara Anakan Fisheries Management Plan*. Segara Anakan Conversation and Development Project Components B and C. Consultan's Report.

- Fe'ral, Jean-Pierre. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268: 121– 145.
- Gimin, R., R. Mohan, L.V. Thinh and A.D. Griffiths. 2004. The relationships of shell dimension and shell volume to live weight and soft tissue weight in the mangrove clam *Polymesoda erosa* (Solander, 1786) from northern Australia. *NAGA, WorldFish Centre Quarterly* 27: 32-35.
- Hallden, C., N. O. Nilsson, I. M. Rading, and T. Sall. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding Lines. *Theor. Appl. Genet* 88:123-128.
- Hauser, L., G.J. Adcock, P.J. Smith, J.H. Bernal Ramirez, and G.R. Carvalho. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *PNAS* 99 (18): 11742-11747.
- Hughes, A.R. and J.J. Stachowicz. 2004. Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance. *PNAS* 101 (24): 8998-9002.
- Imron. 1997. Keragaman Morfologis dan Biokimia beberapa Stok Keturunan Induk Udang Windu (*Penaeus monodon*) Asal Laut yang Dibudidayakan di Tambak. Tesis. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Indriani, F.C., L. Soetopo, Sudjindro, dan A.N. Sugiharto. 2002. Keragaman genetik plasma nutfah kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dan beberapa spesies yang sekerabat berdasarkan analisis isozim. *Biosains* 2 (1): 29 – 39.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castagirole, M.O. Winfield, F. Sala, C. van del Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettshneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vasquez, and A. Karp. 1997. A reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3 (5): 382-390.
- Ledig, F.T. 1992. Human impact on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63: 87-108.
- Nuryanto, A. and A.H. Susanto. 2010. Genetic variability of *Polymesoda Erosa* population in the Segara Anakan Cilacap. *Biotropia* 17 (1): 22-30.
- O'Brien, S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 21: 5748–5755
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (*Proteaceae*). *Jurnal Biologi* XIII (1) : 12 -16.
- Reed, D.H. and R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17 (1): 230-237.
- Rego, I., A.S. Martiane, A.G. Lez-Tizoa N, J. Vieites, F. Leira, and J. Meandez. 2002. PCR technique for identification of mussel species. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 50: 1780-1784.
- Salam, A.M.S. 1994. Keanekaragaman Genetik. Andi Offset. Yogyakarta.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. *Arlequin, version 2.0*. University of Geneva, Geneva.

- Solihin, D.D. 2006. Teknik Elektroforesis. Makalah Pelatihan Teknik Diagnostik Molekuler Untuk Peningkatan Produksi Peternakan dan Perikanan di Kawasan Timur Indonesia, PSHB 10-23.
- Suryadi, H. 2002. Draft Dokumen IBSAP Bagian 3/8, Tinjauan : Keanekaragaman Hayati sebagai Aset Produktif Pembangunan Berkelanjutan. www.polarhome.com (email : nasional-a@polarhome). Diakses tanggal 18 Maret 2006.
- Stepien, C.A., C.D. Taylor, and K.A. Dabrowska. 2002. Genetic variability and phylogeographical patterns of a nonindigenous species invasion: a comparison of exotic vs. native zebra and quagga mussel populations. *Journal of Evolution and Biology* 15: 314–328.
- Tarpy, D.R. 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. soc. Lond. B* 270: 99-103.
- Thaewan-ngiw, B., Klibunga, S., Phanwichen, K., Sangduen, N., Lauhajinda, N. and Menasveta, P. 2004. Genetic diversity and molecular markers of introduced and native apple snails (genera Pomacea and Pila) in Thailand. *Journal Biology Chemistry, Molecular Biology*. 37, 493. *Journal of Evolution and Biology* 15: 314–328.
- Walsh, P.S., D.A Metzger, and R. Higushi. 1991. Chelex 100% as a medium for sample extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 20 (4):506-513.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 (22): 6531-6535.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Andi. Yogyakarta, p. 1-3; 18-21.