

**KERAGAMAN GENETIK ABALON (*Haliotis* sp)
BERDASARKAN MARKA RANDOM AMPLIFIED
POLYMORPHIC DNA (RAPD)DI PERAIRAN BALI**

**GENETIC DIVERSITY OF ABALONE (*Haliotis* sp) ACCORDING
TO RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)
MARKER IN BALI WATERS**

Juliaeta A.B. Mamesah

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Pattimura Ambon (email:jellymamesah@yahoo.com)

Abstrak

Abalon merupakan spesies laut yang memiliki prospek yang cukup baik untuk dikembangkan, mengingat permintaan yang cukup tinggi. Dengan adanya kenyataan ini dikuatirkan keberadaan dari Abalon akan terancam punah. RAPD-PCR (Polymerase Chain Reaction Random Amplified Polymorphic-DNA) adalah salah satu tehnik molecular dengan menggunakan marka yang spesifik untuk mempelajari keragaman genetika. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui keragaman genetika Abalon (*Haliotis* sp) yang berasal dari 4 lokasi yang berbeda di perairan Bali. Analisa di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNPAD, Bandung. Sampel DNA diekstraksi dan diamplifikasi dalam mesin PCR dengan menggunakan 5 (lima) primer; UBC 197, OPB 11, UBC 195, UBC 271 and UBC 101. Hasilnya dilakukan elektroforesis dengan gel agarose. Hasil visualisasi lokus DNA dijadikan data biner untuk menentukan nilai PIC (Polymorphic Information Content) dan H_e (Expected heterozygosity), sedangkan untuk melihat hubungan kekerabatan digunakan pohon filogenik (fenogram) yang dibuat dengan menggunakan software (NTSYS-pc). Hasil penelitian ini menunjukkan Abalon diperairan Bali memiliki keragaman genetik yang tinggi. Hal ini dikarenakan nilai H_e (expected heterozygosity) dan PIC (Polymorphic Information Content) yang relatif tinggi, yakni 0.9879 dan 0.9878. Penelitian ini juga menunjukkan Hubungan kekerabatan dengan 4 kelompok. Jarak genetik yang terletak antara 0,1538462 - 0,8750000

Kata kunci : abalon, RAPD-PCR, primer, keranekaragaman genetik

Diterima....., Alamat korespondensi: Juliaeta A.B Mamesah
(jellymamesah@yahoo.com).

Abstract

Abalone is a marine species that have good prospects for development, given the demand is high enough. Given this reality will concern the existence of Abalone endangered. RAPD-PCR (Polymerase Chain Reaction Random Amplified Polymorphic DNA) is one of the molecular techniques using specific markers to study genetic diversity .The purpose of this study was to determine the genetic diversity of Abalone (*Haliotis* sp) from 4 different locations in the waters of Bali. This research was conducted at the Laboratory of Biotechnology of the Faculty of Fisheries and Marine Science UNPAD, Bandung. DNA samples were extracted and amplified in a PCR machine using the five (5) primers; UBC 197, OPB 11, UBC 195, UBC 271 and UBC 101. The result after electrophoresis in agarose gel. Results visualization of DNA loci used binary data to determine the value of the PIC (Polymorphic Information Content) and He (Expected heterozygosity), whereas kinship used to see trees filogenik (fenogram) are made by using software (NTSYS-pc). The results of this study indicate Abalone Bali waters have high genetic diversity. This is because the value of He (expected heterozygosity) and PIC (Polymorphic Information Content) are relatively high, ie 0.9879 and 0.9878. This study also shows the relationship of kinship with 4 groups. Genetic distance that lies between 0,1538462 - 0,8750000

Key words : abalone, RAPD-PCR, primers, genetic diversity

PENDAHULUAN

Perairan Indonesia mempunyai kekayaan dan keanekaragaman ekosistem, spesies dan genetik yang tinggi di dunia. Dari sejumlah besar spesies-spesies ikan dan binatang air yang ditemukan di sungai-sungai, danau, rawa, estuaria, lingkungan terumbu karang dan laut membentuk komunitas yang beranekaragam dan tingkat persaingan yang tinggi, karena terbatasnya sumberdaya makanan dan lingkungan lainnya.

Keanekaragaman sumberdaya hayati laut, termasuk didalamnya keragaman genetik seringkali dijadikan argument untuk menggambarkan betapa besarnya kekayaan laut Indonesia, salah satu sumber kehidupan masyarakat, bukan lagi tergantung pada daratan, dapat segera terwujud. Oleh karena itu dalam menyikapi hal ini perlu landasan pemahaman yang lebih jelas dimana letak keunggulan keragaman hayati dan keragaman genetik sumberdaya laut tersebut. Keragaman yang tinggi dari suatu sumberdaya tidak akan selamanya terkait dengan keunggulan baik kuantitatif maupun kualitatif. Di laut tropis pada umumnya dicirikan dengan keragaman yang tinggi dari segi jumlah jenis, namun masing-masing kelimpahannya kecil. Sebaliknya di negara beriklim sub tropis jumlah jenis relatif sedikit, namun masing-masing kelimpahannya besar.

Keragaman genetik suatu populasi memiliki arti penting, karena faktor yang mempengaruhi respon suatu populasi terhadap seleksi alam maupun buatan yang dilakukan oleh manusia untuk mengeksploitasi sumberdaya hayati laut tersebut sesuai kebutuhan. Populasi dengan keragaman genetik yang tinggi memiliki peluang hidup yang lebih baik. Hal ini disebabkan karena setiap gen memiliki respon yang berbeda-beda terhadap kondisi lingkungan, sehingga dengan

dimilikinya berbagai macam gen dari individu-individu di dalam populasi maka berbagai perubahan lingkungan yang ada akan dapat direspon lebih baik. Beberapa studi menunjukkan bahwa karakteristik genetik suatu populasi ikan di alam pada umumnya menunjukkan adanya heterogenitas spasial, bahkan pada jarak yang sangat dekat. Keragaman genetik merupakan konsep variabilitas di dalam suatu spesies yang diukur oleh variasi genetik atau unit-unit biokimia dan informasi keturunan yang dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi yang lain, di dalam spesies, varietas, subspecies atau keturunan tertentu (McNeely, 1992). Pada prinsipnya semakin besar ukuran populasi spesies, semakin besar keanekaragaman genetik didalamnya. Akan tetapi peningkatan spesies tertentu dapat menjurus kepenurunan populasi lain, bahkan sampai kepengurangan keanekaragaman spesies tertentu. Hal ini tidak mungkin mendapat keduanya, baik keanekaragaman spesies maksimum maupun keanekaragaman genetik maksimum.

Seperti halnya keanekaragaman ekosistem, keanekaragaman genetik pada kenyataannya memiliki lebih dari satu tingkatan. Keanekaragaman genetik tidak hanya terjadi di antara populasi akan tetapi juga di dalam populasi. Keanekaragaman genetik dalam populasi merupakan bahan dasar untuk evolusi. Populasi dengan keanekaragaman yang lebih tinggi lebih mungkin memiliki sedikitnya beberapa individu yang dapat bertahan terhadap perubahan lingkungan.

Oleh karena perubahan lingkungan berlangsung cepat, maka pengelolaan terhadap keanekaragaman genetik merupakan hal yang sangat penting, baik di dalam maupun di antara populasi, Termasuk pada spesies yang penyebarannya luas. Perbedaan genetik juga sangat penting bagi spesies yang

dibudidayakan di laut, dengan harapan dapat menghasilkan sifat atau karakter yang diinginkan, dan hal ini merupakan basis bagi pertumbuhan industri bioteknologi. (Dahuri, 2003; Indrawan, 2007; Meffe and Carroll, 1977; Norse,1993)

Keragaman genetik turut menentukan keberhasilan suatu populasi untuk dapat beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Individu dengan alel atau kombinasi alel tertentu mungkin memiliki sifat-sifat yang sesuai dan dapat dibutuhkan untuk dapat bertahan serta berbiak di dalam kondisi yang baru (Wayne dan Morin 2004 *dalam* Indrawan *dkk* 2007).

Abalon merupakan komoditas baru dalam akuakultur Indonesia yang perlu dikembangkan karena dua hal utama. Pertama organisme ini memiliki tingkat trofik yang rendah, yaitu konsumen tingkat pertama (herbivora) dengan makanan utama rumput laut. Kedua, abalon masih memiliki harga yang tinggi, bahkan merupakan salah satu makanan mewah baik di dalam maupun luar negeri. Di perairan Indonesia abalon ukurannya relatif cukup besar dan mudah ditemukan di daerah subtidal. Menurut sejarah, di California abalon sudah ditangkap oleh penduduk Amerika keturunan Cina sejak tahun 1850an.

Hewan ini tergolong ke dalam kelas Gastropoda, famili Haliotidae (Huchette *dkk.*, 2003). Di alam dilaporkan terdapat sekitar 100 spesies yang berasal dari genus *Haliotis*, namun yang memiliki nilai komersil hanya sekitar 10 spesies (Takashi, 1980; Fallu, 1991). Permintaan dunia terhadap abalon dari tahun ke tahun cenderung mengalami peningkatan. Adapun pasar utama abalon di negara Asia yaitu Cina, Hong Kong, Korea, Jepang dan Singapura, di samping Amerika Serikat dan negara Uni Eropa. Namun, hingga saat ini mayoritas produksi abalon dunia masih didominasi dari hasil tangkapan di alam.

Pada tahun 2002 diperkirakan produksi abalon dunia mencapai 22.600 ton, dari jumlah tersebut hanya kurang lebih 8.600 ton dihasilkan dari kegiatan budidaya (Gordon dan Cook,2004).

Sementara di Indonesia sampai sekarang baru sedikit orang yang mengetahuinya. Budidaya Abalon mulai diteliti Loka Budidaya Laut Lombok NTB sejak tahun 1999. Uniknya, hewan ini endemik (tidak semua tempat ada). Wilayah Indonesia yang memiliki spesies ini adalah Bali, NTB (Lombok tengah selatan), Ambon, Madura, dan Bajo (Sulawesi Selatan). Di luar negeri abalon biasanya menjadi makanan eksotik yang harganya mahal. Keeksotisan menu abalone tersebut terlihat di salah satu restoran di Hongkong yang memajang produknya di internet. Menu bernama *Abalone with congee* di patok seharga US\$ 82.(Priyambodo *dkk.*)

Pada saat ini terdapat kegiatan perikanan kerang abalon di Indonesia, terutama untuk spesies *Haliotis asinina* dan *Haliotis squamata*. Seperti Negara – negara penghasil abalon lainnya, kegiatan industri kerang abalon di Indonesia mengalami penurunan akibat penangkapan berlebihan yang disebabkan oleh tingginya tingkat permintaan dan penawaran harga yang sangat sangat menarik atas komoditas ini di pasar ekspor. Pelaksanaan sejumlah peraturan tentang pengelolaan wilayah laut yang dilindungi atau kawasan konservasi laut perlu diperkuat agar bias mengatur secara tepat kegiatan pemanenan sumberdaya kelautan. Pengorganisasian komunitas nelayan sangatlah direkomendasikan untuk mendukung pelaksanaan peraturan pengelolaan kawasan konservasi laut atau kawasan bebas penangkapan.

Di Negara, Bali telah sejak lama terdapat kegiatan penangkapan abalon. Berdasarkan pengalamannelayan pengumpul abalon mengatakan

tiga varietas abalone di wilayah penangkapan : abalone hitam, biru dan merah. Varietas merah merupakan varietas abalone termahal diantara ketiganya. Ketiga varietas ini dapat ditemukan si satu lokasi tangkapan yang sama tapi lingkungan yang berbeda tergantung warna karang dan bebatuan. Tahun 1987, para nelayan di Negara Bali, ini mampu mengumpulkan 100 kg abalone dalam sehari, akan tetapi pada saat ini hasil tangkapan hanya sekitar 3 kg per hari. (Hasil survey pendahuluan dan wawancara dengan petani di wilayah Negara Bali). Lokasi penangkapan Abalon berada di tiga (3) Kabupaten : (1) Kabupaten Gianjar : Pantai lebih, desa Pering, Kecamatan Gianjar, Pantai Ketewel, Banjar Pabean, Desa Ketewel. (2) Kabupaten Badung : Pantai Seseh, desa Cemangi, Kecamatan Mengwi dan (3) Kabupaten Jembrana : Pantai Pekutatan, desa Pekutatan,

Negara. Tipe pantai pulau Bali Selatan dan Utara relatif beda.

Produksi kerang abalon saat ini lebih banyak diperoleh dari tangkapan di alam, hal ini akan menimbulkan kekhawatiran akan terjadinya kelangkaan yang tidak mustahil akan berakhir pada kelangkaan atau kepunahan. Sampai saat ini kegiatan penelitian untuk abalone telah banyak dilakukan, akan tetapi untuk keragaman genetik terutama untuk spesies-spesies yang ada di Indonesia masih kurang menjadi perhatian.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan secara non eksperimental dengan pengambilan sampel abalon yang ada di perairan Bali pada empat (4) lokasi yang berbeda. (**Gambar 1**). Analisis DNA dilaksanakan pada Laboratorium Bioteknologi UNPAD. Pelaksanaan penelitian ini selama satu(1) tahun.



Gambar 1. Peta Lokasi Penelitian. (<http://popbali.com/peta-pulau-dan-kawasan-wisata-di-bali/peta-pulau-bali/>)

1. Metode

Metode penelitian ini termasuk dalam metode survei dengan analisis deskriptif kualitatif di laboratorium. Penelitian deskriptif adalah suatu bentuk penelitian yang ditujukan untuk mendeskripsikan fenomena-fenomena yang ada, baik fenomena alamiah maupun fenomena buatan manusia. Fenomena itu bisa berupa bentuk, aktivitas, karakteristik, perubahan, hubungan, kesamaan, dan perbedaan antara fenomena yang satu dengan fenomena lainnya (Sukmadinata 2006).

2. Sampling

Pengumpulan abalon dilakukan dengan metode koleksi bebas di beberapa lokasi pada perairan Bali, yaitu di Desa Air Kuning (Kab. Jembrana), Desa Pekutatan (Kabupaten Jembrana), Desa Klecung (Kab. Tabanan), Desa Canggü (Kab. Badung), Desa Gianyar (Kab. Gianyar) dan hasil budidaya di Balai Besar Budidaya Laut Gondol. Sampel abalone di preparasi langsung di lokasi pengambilannya kemudian di tempat pada botol-botol sampel yang sudah di isi dengan larutan alcohol dan glyserin dengan perbandingan 4:1, kemudian ditempatkan di dalam coolbox yang telah diisi dengan es curai.

3. Ekstrasi dan isolasi DNA

DNA sampel diisolasi menggunakan metoda CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah mengalami modifikasi (Rogers *et al.* 1997 dalam Mulyani 2003).

Isolasi DNA memiliki prinsip memisahkan DNA kromosom atau DNA genom dari komponen-komponen sel lain. Tahap-tahapan Isolasi DNA Abalon menggunakan *Wizard Genomic purification Kit* (Promega).

Langkah pertama dalam isolasi DNA adalah pengambilan otot kaki

Abalon dengan cara menguntingnya sebanyak kurang lebih 10 mg kemudian dimasukkan kedalam tabung *ependorf* 1,5 ml dan digerus kemudian ditambahkan larutan *Nuclei Lysis Solution* dingin sebanyak 300 µl untuk melisiskan membrane sel. Tahap berikutnya diinkubasikan dalam *water bath* dengan suhu 65°C selama 15 menit. Dimasukkan 1,5µl *RNAse solution* lalu campurkan dan diinkubasikan kembali dalam *water bath* dengan suhu 37°C selama 20 menit dan ditiriskan. Ditambahkan 100µl *Protein Precipitation Solution*. Kemudian larutan divortex dan didinginkan di dalam es selama 5 menit, selanjutnya disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke tabung *ependorf* yang baru yang berisi 300µl isopropanol dengan suhu ruang. Di sentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Selanjutnya supernatant dibuang kemudian dicampurkan 300µl ethanol 70% dalam keadaan di suhu ruang. Kembali disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Tahap selanjutnya Ethanol dibuang dan dikeringkan anginkan selama 15 menit. DNA direhidrasi dengan 50 µl selama 1 jam dalam *water bath* dengan suhu 65°C. DNA yang telah diisolasi ini dapat disimpan dalam freezer dan digunakan untuk amplifikasi DNA.

4. Optimasi PCR dan Amplifikasi DNA

Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan kondisi PCR yang optimal. Beberapa variabel seperti konsentrasi primer, konsentrasi cetakan DNA, dan suhu penempelan primer yang digunakan untuk PCR dipelajari dan dicoba untuk mendapatkan produk PCR yang optimal. Untuk memilih primer yang akan digunakan dalam analisis RAPD, setiap populasi Abalon diwakili oleh satu individu yang diambil secara acak dan

diampifikasi menggunakan 5 primer (OPB11, UBC101, UBC195, UBC197 dan UBC271), Primer yang memberikan pita amplifikasi yang tegas dan jelas serta menghasilkan pita DNA polimorfik dipilih untuk mengamplifikasi DNA seluruh contoh Abalon. Amplifikasi DNA dilakukan berdasarkan metode Williams *et al.*(1990) yang dimodifikasi. Daftar primer RAPD dengan ukuran basa.

Tabel 1. Daftar primer RAPD dengan urutan basanya.

Nama Primer	Urutan Basa
OPB 11	5'GTAGACCCGT3'
UBC 101	5'GCGCCTGGAG3'
UBC 195	5'GATCTCAGCG3'
UBC 271	5'GCCATCAAGA3'
UBC 197	5'TCCCGTTC3'

Setiap sampel yang didapatkan direaksikan dengan GoTaq® master mix 2G fast 2X (Promega) 25µmol primer RAPD (10 bp), 10µl DNA sampel sebagai template dan nuclease free water steril dengan volume total 25µl. Semua bahan dimasukkan ke dalam tabung micro tube steril berukuran 200µl khusus untuk alat Thermal Cycler.

Tahap selanjutnya adalah formulasi campuran reaksi PCR dengan primer RAPD seperti yang disajikan pada Tabel 2. dan dimasukkan dalam Thermal Cycler, yaitu suatu alat untuk menaikkan dan menurunkan suhu dengan cepat. Reaksi ini bertujuan untuk mengamplifikasi (mereplikasi) Pita-pita DNA (amplikon) urutan basa khusus.

Tabel 2. Komponen Reaksi PCR

Komponen PCR	Konsentrasi reaksi	1	Volume
GoTaq® master mix 2G fast	2X		12,5
Primer RAPD	25pmol		1,0
DNA template	5µg/µl		2,0
			Ditambahkan sampai
Nuclease Free Water	-		25µl

Proses amplifikasi meliputi 3 tahapan besar, yakni tahap denaturasi DNA dengan suhu 94°C selama 3 menit, tahap penempelan (annealing) 37°C selama 1 menit, dan tahap pemanjangan (ekstensi) 72°C selama 1,5 menit. Saat annealing, homologi sekuens antara primer dan utas DNA turut berperan menentukan keberhasilan reaksi. Penggandaan fragmen DNA yang terkopi oleh primer RAPD dilakukan dengan 3 tahap di atas sebanyak 35 siklus. Fragmen yang dikenali oleh primer merupakan sekuens yang komplementer dengan sekuens primer tersebar di sepanjang genom dan mencerminkan polimorfik yang berkaitan dengan keragaman genetik suatu spesies. Setting program ini disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Setting program PCR

No	Proses	Suhu °C	Waktu (menit)	Keterangan
1	Pre denaturasi	94	3	1 siklus
2	Denaturasi	94	0,25	
3	Annealing	37	1	35 siklus
4	Ekstensi	72	1,5	
5	Final ekstensi	72	7	1 siklus

Proses amplifikasi DNA abalone dimulai dengan menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Penambahan primer dilakukan 1 primer untuk seluruh sampel, sehingga diperoleh 30 sampel dari 6 DNA template dengan 5 primer RAPD (OPB 11, UBC 101, UBC 195, UBC 271 dan UBC 197).

5. Elektroforesis

Sampel DNA yang telah diampifikasi divisualisasikan dengan melakukan elektroforesis menggunakan gel agarose. Gel agarose berkonsentrasi 1% , diperoleh dengan mencampurkan bubuk agarose dan larutan TBE 0,5 X

(TrisBorateEDTA). Tris Borate EDTA adalah cairan buffer yang di dalamnya mengandung Tri base, asam *boric*, dan EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Gel agarose direndam secara *sub marine* dalam running buffer TBE 0,5X. Beda potensial yang digunakan pada proses elektroforesis adalah 75 volt, dengan kuat arus 500mA selama 70 menit.

Gel agarose 1 % dibuat dengan cara menimbang 0,4g bubuk agarose dan ditambahkan TBE sebanyak 40 ml kemudian dipanaskan sampai mendidih dengan menggunakan *Hot Plate Magnetic Stirrer*, setelah agak dingin dituangkan dalam baki yang telag dipasang sisir. Gel yang telah terbentuk dengan sumur-sumurnya disetting dalam mesin elektroforesis dan ditambahkan larutan TBE sebagai buffer hingga gel agarose terendam. Sumur pertama atau terakhir dijadikan blanko dan diisi dengan marker dengan volume masing-masing 5 μ l. Sumur selanjutnya didisi dengan DNA hasil amplifikasi dengan volume 5 μ l dengan ditambahkan *loading dye* sebanyak 2 μ l. Setelah proses elektroforesis selesai, kemudian gel direndam dalam larutan Etidium Bromida selama 20 menit dan setelah itu dilakukan pencucian dengan Aquadest selama 15 menit, kemudian dimasukkan ke dalam uv-illuminator, diamati secara visual apakah genom dalam tiap sumur tampak menyala, kemudian diambil gambar dengan menggunakan kamera digital.

Analisis Data

Setiap pita RAPD dianggap sebagai satu lokus putatif. Hanya lokus yang menunjukkan pita yang jelas yang digunakan untuk skoring: ada (1) dan kosong (0). Adapun nilai PIC (*Polymorphic Information Content*) dan He (*Expected heterozygosity*) dihitung menggunakan formula dari Nei & Li 1979

dalam Taiwu *et al*, 2004 diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$PIC = 1 - \sum_i^n P_i^2 - (\sum P_i^2)^2 + \sum P_i^4$$

Sementara itu nilai He dapat diperoleh dengan menggunakan rumus berikut ini:

$$He = 1 - \sum_i^n P_i^2$$

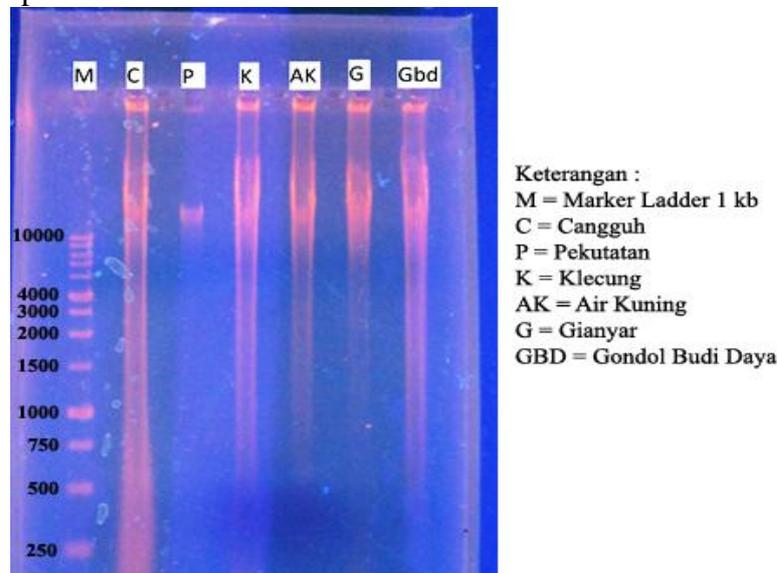
P_i = frekuensi dari alel ke-i

Matriks binari fenotipe RAPD ini kemudian disusun untuk digunakan pada analisis kluster individu dengan menggunakan UPGMA (*unweighted pair group with arithmetic average*) program NTSYS-pc (*numerical taxonomy system*) versi 2.0 (Rohlf, 1997). Nilai kesamaan genetica diambil dari *Simple Matching Coefficient* (Dunn dan Everitt, 1982), sedangkan nilai ketidaksamaan genetik merupakan pengurangan nilai dalam matrik kemiripan oleh nilai 1 (Dunn dan Everitt, 1982). Matrik jarak genetik antar populasi dihitung dengan menggunakan *Nei's unbiased genetic distances* (Nei, 1978) dengan program POPGENE (Yeh *et al.*, 1997). Dendrogram populasi yang dihasilkan dari analisis dilihat dengan menggunakan program TREEVIEW software (Page, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode yang digunakan untuk isolasi DNA mengacu pada metode CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah dimodifikasi (Rogers *et al.* 1997 dalam Mulyani 2003). Jaringan dari Abalon yang diisolasi adalah jaringan otot kaki. Penggunaan jaringan otot kaki ini dilakukan berpedoman dari beberapa penelitian yang telah dilakukan. Isolat DNA yang dihasilkan sebanyak 6 isolat . Isolat tersebut diseleksi untuk mendapatkan DNA yang berkualitas. Penentuan kualitas isolat DNA salah

satunya dilakukan dengan cara elektroforesis. Hasil elektroforesis DNA genom dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA genom dari Sampel Abalon

Hasil isolasi DNA ini kemudian dikuantifikasi dengan menghitung konsentrasi dan tingkat kemurnian menggunakan alat spektrofotometer. Kemurnian DNA dapat dilihat dari rasio absorbansi DNA ($A_{260} : A_{280}$) sehingga dapat dianggap mengandung protein dan

RNA dalam jumlah yang sangat sedikit. Hasil kuantifikasi tersebut dapat dijadikan acuan untuk menilai kelayakan DNA untuk digunakan sebagai DNA *template* pada saat PCR. Kuantifikasi DNA hasil isolasi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Isolasi DNA Genom

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi/C ($\mu\text{g/ml}$)
C	0.152	25.60
G	0.860	43.00
K	0.188	9.40
P	0.140	7.00
AK	0.539	26.95
Gbd	0.643	32.15

Molekul DNA dikatakan murni jika ratio kedua nilai absorban diatas berkisar antara 1,8-2,0. Menurut Sambrook *et al.*, (2001) dalam Pranawaty *dkk* (2012) DNA dengan rasio pada kisaran angka tersebut telah

memenuhi persyaratan kemurnian yang dibutuhkan dalam analisis molekuler. Menurut Linacero *et al.*, (1998) dalam Tenriulo *dkk.*, (2001), kontaminasi ptotein dan bahan organik lainnya ditandai dengan rendahnya nilai rasio $A_{260/280}$ ($< 1,8$),

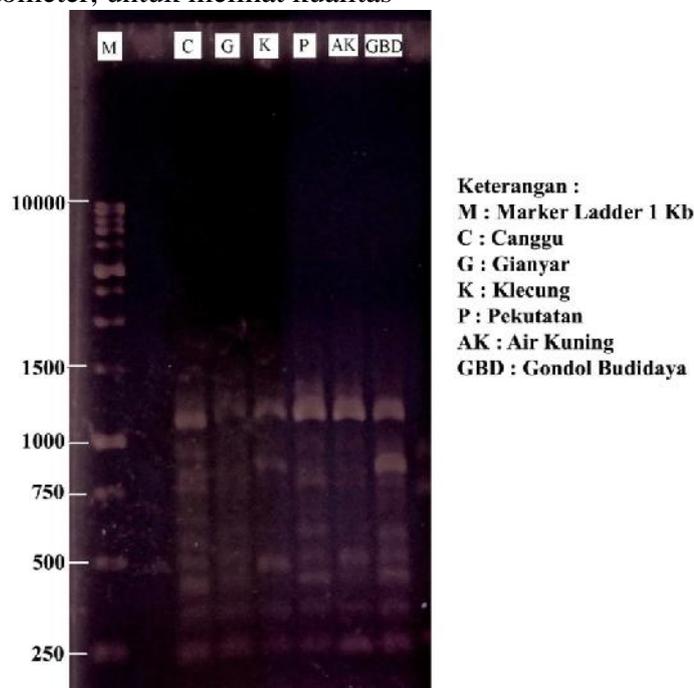
sebaliknya kontaminasi fenol ditandai dengan tingginya nilai rasio tersebut (2,0).

Nilai konsentrasi dari hasil isolasi DNA genom (Tabel 7) menunjukkan konsentrasi pada rentang 7,00 – 43,00 µg/ml. Sampel yang memiliki konsentrasi terbesar (43,00 µg/ml) adalah sampel G, sedangkan sampel dengan konsentrasi yang paling rendah adalah sampel P dengan konsentrasi DNA sebesar 7,00 µg/ml. Konsentrasi yang dihasilkan berada dalam jumlah yang beragam bagi setiap sampel. Hal ini dapat terjadi dikarenakan perbedaan banyaknya otot kaki yang digunakan pada saat isolasi dan dalam proses pengerjaan isolasi DNA yang tidak dapat dikontrol konsistensinya, sehingga konsentrasi DNA yang didapatkan berbeda-beda. Nilai konsentrasi (C) yang baik untuk PCR berkisar antara 0,5 sampai 6,5 µg/ml (Wilkerson *et al.*, 1993).

Selain menggunakan spektrofotometer, untuk melihat kualitas

isolat DNA dilakukan dengan proses elektroforesis pada konsentrasi gel agarose 1 %. Hasil elektroforesis DNA Genom (Gambar 14) menunjukkan semua sampel menghasilkan pita DNA dengan ketebalan pita beragam. Ketebalan pita yang beragam diakibatkan oleh nilai kemurnian pada masing-masing sampel berbeda dan nilai konsentrasi yang diperoleh berbeda-beda (Tabel 7).

Tahapan setelah isolasi DNA adalah amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA ini menggunakan metode RAPD-PCR, dengan 5 primer OPB11, UBC 101, UBC 195, UBC 271, UBC 197, yang teramplifikasi tidak semua primer yang digunakan hanya primer UBC 101 yang berhasil teramplifikasi. Hasil yang didapat adalah pola *loci* (band) DNA seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Amplifikasi DNA Genom Abalon Dengan Primer UBC 101

Teknik RAPD digunakan untuk mendekteksi keanekaragaman genetik identifikasi hubungan sistematik. Taiwu Li.dkk (2004), Klinbunga dkk (2004) Tang dkk (2005) masih menyarankan untuk menggunakan metode RAPD karena metode ini efisien dan memiliki *genetic marker* yang sensitif. Lebih lanjut dikatakan untuk mendapatkan hasil yang maksimal harus diperhatikan kondisi percobaan, termasuk didalamnya ekstrasi DNA juga konsentrasinya, pembuatan sistem pada reaksi PCR.

Seperti terlihat pada Gambar 3 dengan menggunakan primer UBC 101, suhu aneling 37°C sampel abalon berhasil teramplifikasi dan menghasilkan pita yang terletak antara 250 sampai 1500 bp. Ada 19 loci yang diperlihatkan dan hanya satu lokus yang bersifat homozigot yaitu pada lokus 17. Kemudian berturut-turut pada lokus 13 ada 5 alel; pada lokus 6 dan 18 terdapat 4 alel; lokus 2, 4,9,12 dan 15 terdapat 3 alel; lokus 1,11 dan 19 terdapat 2 alel dan pada lokus 3,5,7,8,10,14 ,16 hanya terdapat 1 alel.

Keberhasilan amplifikasi DNA genom dalam tehnik RAPD ditentukan oleh salah satunya adalah urutan basa primer yang digunakan dalam setiap reaksi dan kuantitasnya (kandungan primer dalam setiap reaksi) dan tidak kalah pentingnya adalah suhu aneling waktu proses pada mesin PCR. Teknik RAPD pada prinsipnya didasarkan pada kemampuan primer menempel pada cetakan DNA. Primer yang dirancang berupa primer tunggal pendek agar dapat menempel secara acak pada DNA genom organisme. DNA yang tidak menempel pada primer akan menyebabkan tidak munculnya pita DNA. Perbedaan pola pita yang

ditunjukkan tiap sampel menunjukkan keanekaragaman sampel abalon yang diteliti. Semakin besar perbedaan pola pita yang muncul, maka kekerabatan abalon semakin jauh. Sebaliknya semakin mirip pola pita yang muncul maka kekerabatan antar sampel semakin dekat. Pita-pita yang terbentuk juga menunjukkan polimorfik DNA, seperti yang disajikan pada Tabel 11, untuk primer UBC 101 menunjukkan polimorfik 100 % dengan tingginya persentase polimorfik primer UBC 101 dapat disarankan untuk dipakai sebagai primer untuk mengetahui keanekaragaman genetik dari *Haliotis* sp, hal ini juga ditemukan oleh Tang.S dkk (2005) pada *H. Asinina*.

Analisis nilai He digunakan untuk mengetahui tingkat heterozigositas atau keragaman dari suatu lokus. Nilai He menitik beratkan kepada prediksi heterozigositas dari suatu sampel populasi. Lokus heterozigot menunjukkan bahwa lokus tersebut memiliki pasangan alel berbeda yang menempati posisi tertentu pada suatu kromosom homolog (Nei 1987 dan Hearne *et al.* 1992).

PIC merupakan nilai yang menunjukkan tingkat informasi dari suatu penanda genetik. PIC biasanya digunakan untuk mengukur suatu penanda genetik yang diturunkan. Nilai PIC lebih kecil daripada nilai heterozigositas yang diharapkan (He). Hubungan heterozigositas dengan lokus polimorfik ialah bahwa semakin tinggi nilai heterozigositas suatu lokus, maka semakin polimorfik lokus tersebut (Nei & Li 1979 dalam Taiwu *et al.*2004). Berdasarkan hasil analisis didapat nilai He dan PIC dari kedua primer seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Nilai He dan PIC dari Primer UBC 101

Nama Primer	Nilai He	Nilai PIC
UBC 101	0,9879	0,9878

Tabel 6. Urutan Basa dari RAPD primer, Ukuran Pita, jumlah pita yang teramplifikasi dan persentase pita polimorfik dan monomorfik yang dihasilkan dari analisis RAPD dari *Haliotis* sp

Primer	Urutan basa	Ukuran Pita (bp)	Jumlah Pita	Pita Polimorfik (%)	Pita Monomorfik (%)
UBC101	5'GCGCCTGGAG3'	250-2000	47	94,74	5,26

Dari Tabel 6 diatas dapat dilihat, pada primer UBC 101 dengan ukuran pita terletak antara 250-1500 teramplifikasi 47 pita dengan 94,74 % pita polimorfik dan pita monomorfik 5,26%.

Data matrik biner diolah untuk menghitung nilai H_e (*expected heterozygosity*) dan PIC (*Polymorphic Information Content*). Nilai H_e dan PIC dihitung menggunakan formula dari Nei & Taiwu 1979 dalam Taiwu *et al.*, 2004. Analisis nilai H_e digunakan untuk mengetahui tingkat heterozigositas atau keragaman dari suatu lokus. Nilai H_e menitikberatkan kepada prediksi heterozigositas dari suatu sampel populasi. Nilai H_e sama dengan atau kurang dari 0,5 tidak dapat dijadikan sebagai acuan heterozigositas. Lokus heterozigot menunjukkan bahwa lokus tersebut memiliki pasangan alel berbeda yang menempati posisi tertentu pada suatu kromosom homolog (Nei 1978 dan Hearne *et al.* 1992).

PIC merupakan nilai yang menunjukkan tingkat informasi dari suatu penanda genetik. PIC biasanya digunakan untuk mengukur suatu penanda genetik yang diturunkan. Nilai PIC lebih kecil daripada nilai heterozigositas yang diharapkan (H_e). Hubungan heterozigositas dengan lokus polimorfik ialah bahwa semakin tinggi nilai heterozigositas suatu lokus, maka semakin polimorfik lokus tersebut. Berdasarkan hasil analisis didapat nilai H_e dan PIC dari primer UBC 101 seperti pada Tabel 4 .

Berdasarkan hasil perhitungan pada Tabel 5, nilai H_e yang diperoleh adalah

0,9879 untuk primer UBC 101. Nilai H_e ini dapat dikatakan memiliki heterozigositas yang tinggi dimana nilainya lebih besar dari 0,5 sehingga dapat dijadikan sebagai acuan heterozigositas.. Hal ini sesuai dengan pernyataan Liu and Cordes, 2004 dimana lokus yang heterozigositasnya tinggi menunjukkan jumlah alel yang semakin besar.

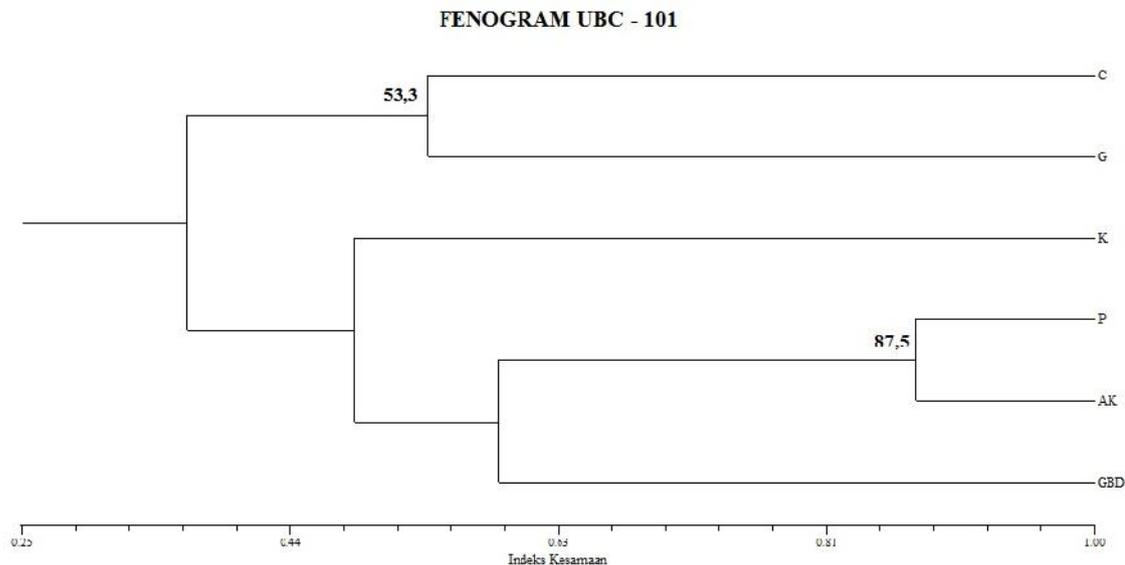
Nilai PIC yang dihasilkan dari penelitian ini sudah dapat dinilai polimorfik dan dapat dijadikan sebagai penanda genetik yang baik. Liu and Cordes, 2004 mengungkapkan bahwa nilai PIC lebih besar dari 0,7 ($PIC > 0,7$), merupakan penanda genetik yang memiliki polimorfisme tinggi dan bisa dijadikan sebagai penanda genetik yang baik dan efisien untuk menyelidiki keanekaragaman genetik.

Keanekaragaman genetika dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotip suatu organisme yang dapat dilihat dengan mata telanjang, atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi dari satu tempat ke tempat lain (Suryanto, 2003 dalam Litaay *dkk.*, 2012).

Dari analisis Ntsys untuk primer UBC 101 di dapat kesamaan genetik Dengan menggunakan metode Unweighted Pair-Grouping Method with Arithmetic Averaging (UPGMA), dihasilkan fenogram jarak genetik (Gambar 4). fenogram menunjukkan hubungan kekerabatan antar sampel abalon yang diteliti. Hubungan kekerabatan tersebut

membentuk 4 kelompok. Kelompok pertama terdiri dari P dan AK, kelompok kedua terdiri dari P, AK dan GBD,

kelompok ketiga terdiri dari P, AK, GBD dan K, dan kelompok keempat terdiri dari C dan G.



Gambar 4. Fenogram Kesamaan Genetik Abalon *Haliotis* sp dengan Primer UBC101

Tabel 7. Rata-rata Jarak Genetik Abalon

Nama lokasi	C	G	K	P	AK	GBD
C	*****					
G	0.5333333	*****				
K	0.3750000	0.1538462	*****			
P	0.3333333	0.4000000	0.5000000	*****		
AK	0.3750000	0.3076923	0.5714286	0.8750000	*****	
GBD	0.4444444	0.5333333	0.3750000	0.6666667	0.5000000	*****

Jarak genetik yang terletak antara 0,15385 - 0,87500 (Tabel 7) menunjukkan nilai keanekaragaman genetik yang tidak terlampau jauh antara satu populasi dengan populasi yang lain. Nilai jarak genetik menunjukkan hubungan kekerabatan yang berbanding terbalik. Semakin besar jarak genetik antara individu semakin dekat hubungan kekerabatan antar individu. Hal tersebut ditunjukkan oleh sampel abalon P dan AK adalah 0,87500. Sedangkan

sampel abalon G dengan AK hubungan kekerabatannya jauh dengan kisaran jarak genetiknya 0,15385.

Jarak genetik merupakan tingkat perbedaaan gen (perbedaaan genom) diantara suatu populasi atau spesies (Nei, 1987 dalam Litaay dkk, 2012). Jarak genetik digunakan untuk menunjukkan seberapa dekat kekerabatan antar genetik abalon *Haliotis* sp tersebut. Banyaknya kesamaan dalam nilai yang ditunjukkan oleh nilai jarak genetik, menunjukkan

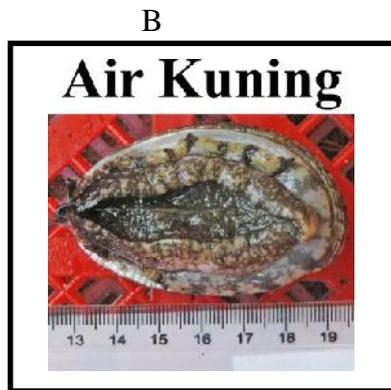
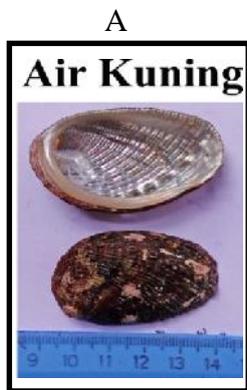
keanekaragaman abalon *Haliotis* sp yang tinggi.

Menurut Singh (1995) (Litaay *dkk*, 2012) bahwa hubungan isolat individu atau keseluruhan populasi dapat dinyatakan dalam angka-angka, analisis ini juga dapat ditampilkan dalam fenogram. Dengan menggunakan metode *Unweighted Pair-Grouping Method with Arithmetic Averaging* (UPGMA), dihasilkan fenogram jarak genetik (Gambar 4). Fenogram menunjukkan hubungan kekerabatan antar sampel abalon yang diteliti. Hubungan kekerabatan sampel abalon disebabkan adanya perkawinan silang antara individu yang ada di wilayah perairan tersebut. Perkawinan silang tersebut akan menghasilkan keturunan yang beranekaragam bahkan ada yang identik ketika dua individu yang melakukan persilangan memiliki gen yang sama. Sampel abalon yang memiliki jarak genetik yang relatif besar, diduga berasal dari tetua yang berkerabat dekat, sebaliknya sampel abalon yang jarak genetik yang relatif kecil diduga berasal dari tetua yang jauh hubungan kekerabatannya. Keanekaragaman pada abalon disebabkan adanya persilangan heterozigot pada induk abalon.

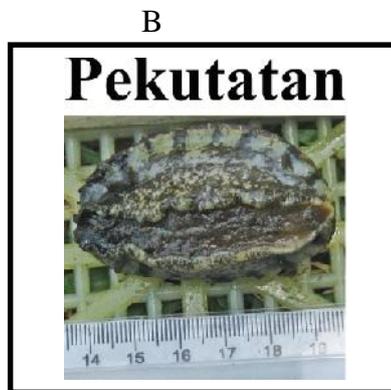
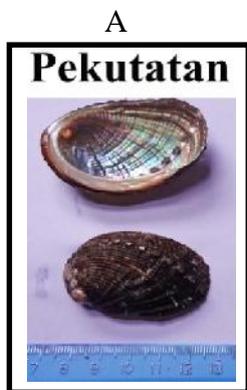
Apabila di hubungkan dengan kondisi habitat, stasiun Pekutatan (P) dan stasiun Air Kuning (AK), kedua stasiun ini lokasinya berdekatan dan tekstur substratnya tidak jauh di kedua stasiun ini di dominasi oleh alga hijau (*Ulva* sp) dan alga coklat (*Sargassum* sp)(Gambar 19 dan 20) Apabila dilihat dari warna cangkang baik bagian luar maupun dalamnya yang di dominasi warna merah (Gambar 5).Sedangkan untuk stasiun Budidaya Gondol hubungan kekerabatan dekat dengan kedua stasiun Pekutatan dan Air

Kuning karena induk yang dibudidayakan di Balai Besar Budidaya biota Laut Gondol sebagian besar di ambil dari daerah Pekutatan, walaupun ukuran tubuhnya jauh berbeda karena abalon yang di budidaya mempunyai ukuran tubuh yang lebih besar dan ketebalan cangkangnya lebih tebal di bandingkan abalon yang berasal dari Pekutatan. Dilihat dari warna cangkangnya, untuk warna cangkang bagian luar di dominasi oleh warna hitam sedangkan warna cangkang bagian dalam lebih bervariasi warnanya dibandingkan abalon yang terdapat di stasiun lainnya. Sedangkan untuk abalon dari stasiun Klecung membentuk kelompok dengan ketiga stasiun diatas karena lokasinya memang berdekatan (Gambar 1, peta lokasi penelitian) walaupun tekstur substrat pada lokasi ini didominasi oleh pasir sedang (69,29 %). Abalon yang berasal dari Canggü dan Gianyar membentuk kelompok sendiri. Dilihat dari warna cangkangnya abalon yang berasal dari perairan Canggü dan Gianyar warna cangkangnya bagian luar di dominasi oleh warna merah dan warna cangkang bagian dalam muncul warna kuning selain warna merah, biru dan hijau dan warna cangkang yang lebih cerah. Menurut Rusdi *dkk* (2010) Pakan abalon dapat mrmpengaruhi pertumbuhan cangkang dan kecerahan warna cangkang. Pada perairan Canggü merupakan habitat yang direkomendasikan oleh Septory *dkk* (2012, *inpress*) karena memenuhi persyaratan untuk dijadikan habitat abalon di lihat dari kondisi substrat pasir kasar berbatu dan ketersediaan makanan yang cukup, artinya pada perairan tersebut terdapat alga hijau (*Ulva* sp),dan alga coklat (*Sargassum* sp).

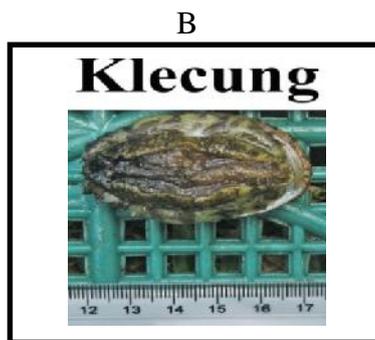
Stasiun 1



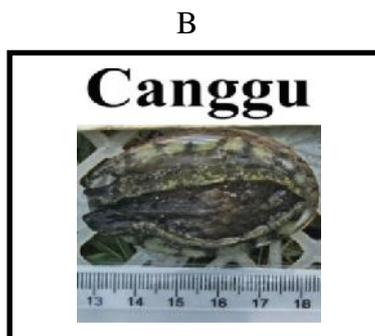
Stasiun 2

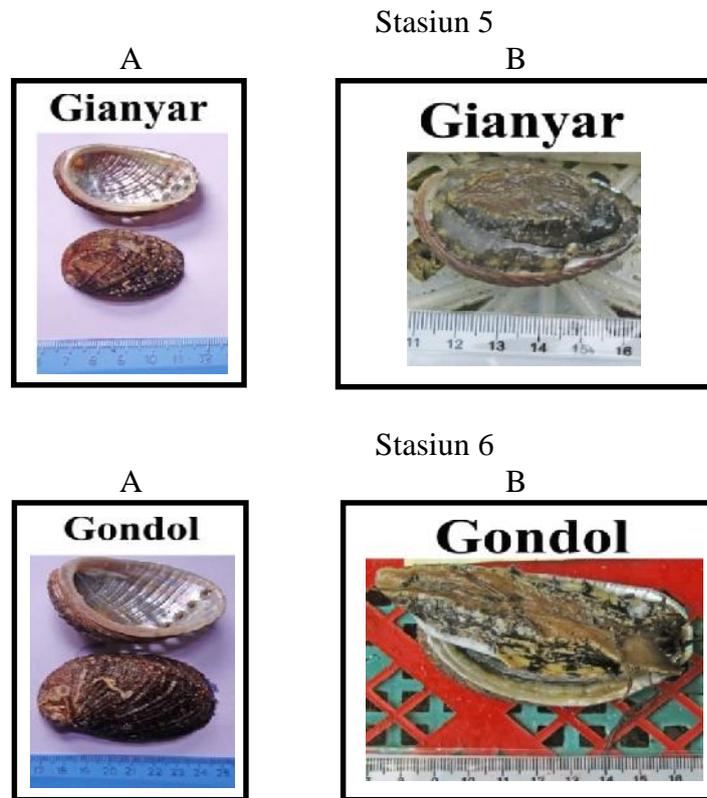


Stasiun 3



Stasiun 4





Gambar 5. Cangkang dan tubuh Abalon (*Haliotis* sp) di Enam (6) Lokasi Penelitian (A: Cangkang; B: Cangkang dan isinya)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa heterosigositas Abalon (*Haliotis* sp) di perairan Bali masih tinggi dan hubungan kekerabatannya dekat, hal ini artinya kelangsungan hidup dari abalon boleh dikatakan belum dikuatirkan mengalami kepunahan dan ditinjau dari hubungan kekerabatan artinya terjadinya reproduksi tidak akan mengalami kendal, akan tetapi apabila terus menerus terjadi penangkapan yang tidak terkendali populasinya di alam akan semakin menurun ini dibuktikan dengan pernyataan dari nelayan setempat bahwa mereka hanya dapat menangkap abalon 3 kg perhari. Apabila hal ini berlangsung terus menerus dikuatirkan akan terjadi penurunan populasi yang berdampak pada terjadinya tekanan silang dalam (*inbreeding depression*) dan ini berdampak pada penurunan heterozigositas, dan hal

bukan tidak mungkin akan terjadi kelangkaan abalon di perairan Bali.

Simpulan

Hubungan kekerabatan abalon *Haliotis* sp di perairan Bali termasuk hubungan kekerabatan yang dekat dengan jarak genetik yang terletak antara 0,30769 - 0,87500, menunjukkan nilai kesamaan genetik yang tidak terlampau jauh antara satu individu dengan individu yang lain. Sedangkan untuk Keanekaragaman gentiknya tinggi dengan nilai He (Heterosigositas yang diharapkan) diperoleh adalah 0,9879 dengan primer UBC 101.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Tim promotor, Prof.Dr.Ir. Dulmi'ad Iriana, Parof.Dr.Ir. Ootong Suhara Djunaedi, M.S dan Dr.Ir. Ayi Yustiati, M.Sc atas masukan dan saran-sarannya. Terima kasih kepada Ir. Ibnu Dwi Buwono yang telah banyak membantu pada waktu analisa di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNPAD.

Daftar Pustaka

- Anonim,.2015. <http://popbali.com/peta-pulau-dan-kawasan-wisata-di-bali/peta-pupau-bali/>. Diundu 13/03/2015. Jam 05.55 am.
- Dahuri,Rohmin. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut. Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia*. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Dunn,G and B.S. Everitt. 1982. *An Introduction to Mathematical Taxonomy*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fallu, R. 1991. *Abalone Farming*. Fishing New Book. London. Pp 196.
- Gordon, H.R. and P.A. Cook. 2010. World Abalone Supply, Market, Pricing. *J.Shellfish Res.* 29:569-571.
- Hearne, C.M., S. Ghosh and J.A. Todd. 1992. Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits. *Trend Genet* 8: 288-294.
- Huchette, S.M.H., C.S. Koh and R.W. Day. 2003. Growth of Juvenil Blacklip Abalone (*Haliotis rubra*) in Aquacultur Tanks: Effects of Density and Amonia. *Aquacultur* 219:457-470.
- Indrawam, M., R.B. Primack., J. Supriatna. 2007. *Biologi Konservasi*. Penerbit Yayasan Obor Indonesia, Conservation Internasional-Indonesia, Pusat Informasi Lingkungan Hidup Indonesia (PILI), Yayasan WWF Indonesia, Uni Eropa, dan YABSHI- Yayasan Bina Sains Hayati Indonesia, Jakarta.
- Klibunga,S., P.Amparyup., R. Leelatanawit., A. Tassanakajon., I. Hirono., T. Aoki., P. Jarayabhand., P. Menasveta. 2004. Species Indentification of the Tropical Abalone (*Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* and *Haliotis varia*) in Thailand Using RAPD and SCAR Markers. *Jurnal of Biochemistry and Molecular Biology*.Vol.37.2:@13-222.
- Litaay,M., Rosana Agus., St Ferawati., Rusmidin. 2010. Potensi Kekerangan Abalon Sulawesi Selatan. Prospek dan Tantangan Pengelolaan. *Prosiding Simposium Nasional Pengelolaan Pesisir, laut dan Pulau-pulau Kecil*. Hal. 100-104.
- Litaay, M., Rosana Agus., St Ferawati., Rusmidin. 2012. Variasi Genetik Abalon Tropis Haliotis asinina Asal Sulawesi Selatan. *ICAI 2012*, Semarang 23-24 November 2012.
- Meffe,G,K. and C. R.Carrol. 1994. *Pricipal of Conservation Biology*. Sinauer Associates, INC Publisher Suderland, Massachusettes.
- McNeely, J.A. 1992. *Ekonomi dan Keanekaragaman Hayati. Mengembangkan dan Memanfaatkan Perangsang Ekonomi Untuk Melestarikan Sumberdaya Hayati*. Diterjemahkan oleh Yayasan Obor Indonesia, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta. 363 hal.

- Mulyani, Y. 2003. *Isolasi dan Karakteristik Mikrosatelit pada Mangga*. Thesis. Jurusan Biologi, Institut Teknologi Bandung.
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic distance From a Small Numbers of Individuals. *Genetic* 89:583-590.
- Norse, Elliot A. 1993. *Global Marine Biological diversity. A Strategy for Building Conservation Into Decision Making*. Island Press, Washington, D.C.
- Page, RDM. 1996 TREEVIEW: An Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computer. *Computer Application in the Biosciences* 12:357-358.
- Pranawaty, R.N., I.D. Buwono., E. Liviaty. 2012. Aplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Konvensional dan Real Time PCR Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus Pada Kepiting. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. Vol.3 No. 4 : 61-74.
- Priyambodo, B., Y. Sofyan., I.B.M, Jaya Suastika. 2005. Produksi Benih Kerang Abalon (*Haliotis asinina*) di Loka Budidaya Laut Lombok. *Seminar Nasional Tahunan Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan*. Perikanan dan Kelautan UGM, Yogyakarta.
- Septory, R., Sophia, L., Johan Risandi., Ibnu Rusdi. 2012. *Aplikasi Decision Support System (DSS) Untuk Pengembangan Budidaya Abalon di Perairan Selat Bali*. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol (Inpress).
- Shepherd, S.A., Brown LD. 1993. What is an Abalone Stock: Implication for The Role of Refugia in Conservation. *Can J. Fish Aquat Sci* 50:2001-2009.
- Sukmadinata. 2006. *Metode Penelitian Pendidikan*. Posdakarya, Bandung.
- Takashi. 1980. *Abalone and Their Industry in Japan*. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, 165-177 p.
- Taiwu, Li., Wenxin Yang., Xiurong Su., Zhibiao Yang., Hao Guo. 2004. RAPD Analysis of Genetic Diversities of Three Species of Abalone. *Journal of Shellfisheries Research*. Vol.3 No.4. pp 1139.
- Tang, P. Aporn., K. Sirawut., T. Anchalee., J. Padermsak., M. Piamsak. 2005. Genetic Heterogeneity of The Tropical Abalone (*Haliotis asinina*) Revealed by RAPD and Microsatellite Analysis. *Jurnal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 182-190.
- Tenriulo, A., E. Suryati., A. Parenrengi., Rosmiat. 2001. Ekstraksi DNA Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Dengan Metode Fenol Kloroform. *Marina Chemica Acta. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hassanuddin*. Vol.2. No.2:6-10.
- Wilkerson, R.C., T.J. Parsons., D.G. Albright., T.A. Klein and M.J. Braun. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Readily Distinguish Cryptic Mosquito Species (Diptera: Culicidae: Anopheles). *Ins.Mol.Biol.* 1:205D21.