

Polimorfisme Enzim Isositrat Dehidrogenase, Laktat Dehidrogenase dan α -Glicerofosfat Dehidrogenase pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab.) Tahan Hidrogen Sulfida

Isocitrate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and α -glycerophosphate dehydrogenase polymorphysm enzyme of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) which is hydrogen sulfide resistant

OKID PARAMA ASTIRIN^{1,✉}, SUTIMAN BAMBANG SUMITRO²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS), Surakarta 57126

²Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya (Unibraw), Malang 65145

Diterima: 22 Mei 2006. Disetujui: 29 Juni 2006.

ABSTRACT

The hydrogen sulfide is one of compound which very often found in the shrimp pond caused by anaerobic decomposition or as a natural condition of the sea water which have volcano activity. This research was obtaining information of the differences of genetic expression between black tiger shrimp which could resist to H₂S and the one which could not survive in this H₂S. This research also trying to obtain information the genetic variety which could resist to H₂S. The genetic variety of black tiger shrimp which could resist to H₂S has been analysis with allozyme electrophoresis technique, using specific tissue meat and buffer CAPM (Citric Acid Aminopolimorpholine) pH 6. From the three enzymes analyzed it could be detected that IDH enzyme (Isocitrate dehydrogenase) has locus polymorphic, whereas enzyme α -GDP (α -glycerophosphate dehydrogenase) and LDH (lactate dehydrogenase) with monomorphic locus. The average heterozygosity for the group which could resist to H₂S is 0.070, whereas the group which could not survive in the H₂S is 0.042. The control group has heterozygosity 0.041. The group which could resist to H₂S with higher heterozygosity will have bigger chance to survive and have better adaptation ability in environmental changes. A high heterozygosity made possible for genetic population improvement by exploiting the good gene.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: *Penaeus monodon* Fab., H₂S, isocitrate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, α -glycerophosphate dehydrogenase, allozyme.

PENDAHULUAN

Dewasa ini perkembangan usaha perikanan khususnya komoditas udang penaeid menunjukkan peningkatan yang nyata dan potensi besar dalam menghasilkan devisa negara tanpa terpengaruh oleh krisis ekonomi. Pada tahun 1984, budidaya udang penaeid hanya berkisar 20% dari total produksi penaeid. Data yang dihimpun sejak tahun 1984 sampai 1999 menunjukkan produksi budidaya udang meningkat lebih dari enam kali lipat (FAO, 2001). Jenis udang yang paling banyak diusahakan baik dengan budidaya maupun penangkapan di Indonesia adalah udang windu (*Penaeus monodon* Fab.). Dalam 5 tahun terakhir produktivitas budidaya udang windu menunjukkan kecenderungan penurunan. Penurunan ini diakibatkan antara lain oleh serangan penyakit terutama virus (*white spot syndrome virus*; WSSV), buruknya manajemen budidaya (Haryanti *et al.*, 1993; Haryanti *et al.*, 2003), penurunan kualitas air (Chanratchakool, 2003; Leophairatana, 2003; Deviana, 2004) dan rendahnya keragaman genetik baik pada induk maupun pada benih udang windu yang dihasilkan (Moria *et al.*, 2003).

Faktor yang memungkinkan terjadinya kegagalan produksi udang berdasarkan hasil survai yang telah dilakukan pada bulan Oktober 2003 salah satunya adalah penurunan kualitas lingkungan budidaya tambak, sehingga menyebabkan terbentuknya senyawa H₂S (hidrogen sulfida) di dasar tambak. Senyawa ini diperkirakan akan menyebabkan pertumbuhan udang terhambat, penurunan daya tahan terhadap penyakit dan kematian udang. Menurut pemantauan Deviana (2004) di tambak daerah Jawa Timur senyawa H₂S umumnya timbul sesudah 1,5 bulan budidaya udang.

Timbulnya H₂S di sedimen menjadi masalah tersendiri dalam budidaya udang karena sifat biologi udang windu yang termasuk hewan *nocturnal*, sepanjang siang banyak berada di dasar tambak, dan aktif di malam hari. Kondisi ini menyebabkan besar kemungkinan udang windu mengalami keracunan oleh paparan H₂S. Shigueno (1986, *cit.* Chamberlain, 1988) dan Buwono (1993) menyatakan bahwa udang kehilangan keseimbangan pada kadar H₂S antara 0,1-2,0 mg/L dan mengalami mortalitas pada kadar 4 mg/L, namun menurut Boyd (1982, *cit.* Boyd, 1992) konsentrasi H₂S sebesar 0,01-0,05 mg/L sudah dapat mematikan organisme akuatik. Laporan Porter *et al.* (1986, *cit.* Yusoff *et al.*, 1998) menyatakan bahwa H₂S sedimen tambak kadang dapat mencapai lebih dari 500 μ g/L.

✉ Alamat Korespondensi:
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126.
Tel./Fax.: +62-271-663375
e-mail: parama_astirin@yahoo.com

Perairan laut dalam di kawasan Aceh termasuk jalur circum Pasifik dengan gunung berapi aktif yang menghasilkan beberapa senyawa di antaranya H₂S. Menurut Warwick *et al.* (1987 *cit.* Arnawati, 2003), dengan mutasi, seleksi alam, pengaruh lingkungan dan perkawinan akan timbul keragaman genetik. Faktor-faktor tersebut dapat menyebabkan terjadinya perubahan susunan genetik individu dan selanjutnya mempengaruhi susunan genetik populasi.

Keragaman genetik udang windu terutama yang berasal dari tangkapan alam relatif tinggi. Heterozigositas udang windu asal Aceh, Sumbawa dan Jawa Timur hasil tangkapan alam menurut penelitian yang dilakukan oleh Moria *et al.* (2003) secara berturut-turut 0,150, 0,050 dan 0,105. Rendahnya heterozigositas merupakan gambaran buruknya keragaman populasi yang meliputi laju pertumbuhan, ketahanan terhadap perubahan lingkungan perairan, ketahanan terhadap serangan penyakit (Leary *et al.*, 1985, *cit.* Sugama, 1993), kemampuan mengkonversi pakan, kelangsungan hidup serta seringkali dapat meningkatkan terjadinya abnormalitas (Wibowo, 2001; Moria *et al.*, 2003). Tingginya nilai heterozigositas populasi udang windu asal Aceh menimbulkan dugaan bahwa populasi ini menyimpan karakter ketahanan terhadap senyawa H₂S.

BAHAN DAN METODE

Penaeus monodon Fab. *juvenil*, dengan induk berasal dari Aceh dipelihara di Laboratorium Budidaya Perikanan, Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol, Bali. Sulfida sedimen dihasilkan melalui stimulasi periodik dengan injeksi larutan stok H₂S. Pemberian H₂S dilakukan dengan mengeluarkan larutan stok H₂S yang telah diatur konsentrasinya kemudian dialirkan ke bak uji menuju sedimen dengan menggunakan botol infus (metode Yusoff *et al.*, 1998 yang dimodifikasi). *P. monodon* dipelihara dalam bak pemeliharaan. Bak perlakuan yang dibagi menjadi kelompok bak I-a berisi *P. monodon* dengan H₂S konsentrasi 0,072 mg/L, kelompok bak I-b *P. monodon* dengan H₂S konsentrasi 0,092 mg/L dan kelompok bak I-c *P. monodon* dengan H₂S konsentrasi 0,112 mg/L. Kelompok bak I-d bak merupakan kontrol yaitu kelompok udang yang tidak diperlakukan dengan H₂S. Masing-masing kelompok dengan 3 ulangan. Udang windu dipelihara dalam bak dengan aerasi di permukaan air, volume air 25 L (Metode Ali-Poernomo, 2003, komunikasi pribadi) yang mengandung H₂S disentralisir pada area diameter 30 cm dengan ketebalan sedimen 5 cm, bak pemeliharaan kapasitas 30 L air, padat tebar adalah 25 ekor pada masing-masing bak. Pemberian pakan dengan jenis pelet yang disesuaikan dengan berat udang windu, diberikan sehari 5 kali.

Enzim yang diterapkan untuk menganalisis polimorfisme pada udang windu: 1 enzim dari kelompok NADP (*nicotine adenine diamine phosphate*) yaitu IDH (*isocitrate dehydrogenase*) dan 2 enzim dari kelompok NAD⁺ (*nicotine adenine diamine*) yaitu α -GDP (*α -glycerolphosphate dehydrogenase*) dan LDH (*Lactat dehydrogenase*). Metode analisis mengikuti prosedur yang telah dikembangkan oleh Sugama dan Priyono (1998), *staining* mengikuti prosedur Shaw dan Prasad (1970, *cit.* Sugama, 1993). Pewarnaan dilakukan tergantung dari jenis enzim yang akan dianalisis. Reagen yang digunakan adalah PMS (*Phenazine methosulfat*) dan NBT (*nitroblue tetrazolium*).

Penamaan lokus dan alel mengikuti metode Allendorf dan Utter (1979). Data diperoleh dari hasil interpretasi pita yang muncul dan selanjutnya digunakan untuk menghitung beberapa parameter keragaman genetik yang meliputi frekuensi alel, jumlah alel per lokus, heterozigositas. Keseluruhan parameter tersebut diolah dengan *software package* GENEPOP (Raymond dan Rousset, 1995).

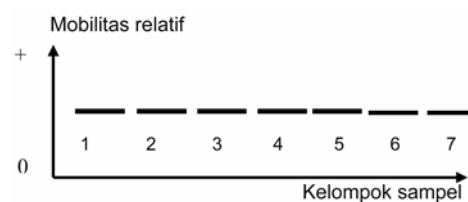
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis elektroforesis pada 3 enzim terdeteksi 4 lokus dengan satu lokus polimorfik yaitu IDH* (*isocitrate dehydrogenase*). Lokus yang polimorfik menunjukkan bahwa terdapat keragaman genetik terutama pada populasi udang windu yang tahan terhadap senyawa H₂S. Semakin tinggi prosentase keragaman maka semakin tinggi heterozigositasnya yang berarti pula makin tinggi pula peluang individu tersebut untuk bertahan hidup. Enzim yang terekspresi adalah protein enzim yang mencerminkan informasi genetik berupa gen yang terkandung dalam lokus-lokus pada kromosom (Watson *et al.*, 1998). Suatu lokus dianggap polimorfik bila frekuensi dari alel yang paling sering muncul sama atau kurang dari 0,99 (Sugama dan Prijono, 1998; Permana *et al.*, 2001).

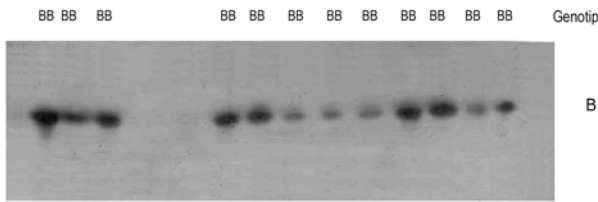
Kedua macam enzim yang terdeteksi dari jaringan daging merupakan enzim yang membutuhkan koenzim. Koenzim adalah senyawa organik yang berbobot molekul rendah, stabil terhadap panas dan dibutuhkan untuk aktifitas enzim. Sebagian besar enzim dengan koenzim berikatan secara non kovalen. Enzim yang akan ditentukan ekspresinya dalam penelitian ini memerlukan koenzim NAD⁺ dan NADP. Koenzim berperan dalam pemindahan hidrogen dan ion H⁺ dalam reaksi pewarnaan. Reagen lain yang berperan dalam analisis *allozyme* adalah NBT (*nitroblue tetrazolium*) 0,1% dan PMS (*phenazine methosulfat*) yang berperan sebagai pengemban elektron antara NADH/NADPH dan zat warna yang menyebabkan warna NBT tereduksi menjadi berwarna biru. Selain ketiga hal tadi perlu ditambahkan substrat yang sesuai dengan enzim yang diamati.

α -Glycerolphosphate dehydrogenase (α -GDP)

Aktivitas enzim ini terdeteksi pada jaringan daging. Muncul 1 lokus di kutub positif, sehingga dapat dikatakan bahwa enzim tersebut dikontrol oleh satu lokus yaitu α -GDP*. Lokus tersebut dikode oleh satu macam alel sehingga bersifat monomorfik. Hasil pembacaan terhadap pita yang muncul menunjukkan bahwa tidak terdapat keragaman genetik pada semua kelompok sampel baik yang tahan maupun mati oleh adanya senyawa H₂S untuk enzim α -GDP. Pola umum diagram *allozyme* α -GDP* pada jaringan daging udang windu ditunjukkan pada Gambar 1.

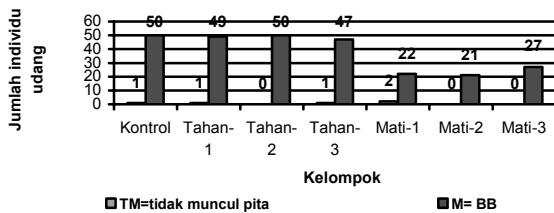


Gambar 1. Zymogram lokus α -GDP*. Keterangan: 1. Kelompok kontrol, 2. Kelompok tahan H₂S 0,072 ppm, 3. Kelompok tahan H₂S 0,092 ppm, 4. Kelompok tahan H₂S 0,112 ppm, 5. Kelompok mati oleh H₂S 0,072 ppm, 6. Kelompok mati oleh H₂S 0,092 ppm, 7. Kelompok mati oleh H₂S 0,112 ppm



Gambar 2. Ekspresi enzim monomorfik dari enzim α -GDP yang pada semua kelompok adalah sama.

Enzim α -GDP berfungsi sebagai katalisator dalam metabolisme glikogen yaitu mengoksidasi α -Gliserofosfat menjadi dihidroksiaseton fosfat. NAD^+ berperan dalam pemindahan ion hidrogen dari hasil oksidasi α -gliserofosfat menjadi dihidroksiaseton fosfat oleh enzim α -GDP. PMS akan direduksi oleh NADH selanjutnya akan mengoksidasi NBT menjadi berwarna biru. Dihidroksiaseton fosfat selanjutnya akan masuk ke jalur glikolisis atau glukogenolisis. Reaksi tersebut banyak berlangsung di otot atau daging. Struktur dari enzim α -GDP adalah tetramer yang merupakan enzim multimerik yaitu enzim yang tersusun atas lebih dari satu rantai polipeptida/subunit. Perbandingan ekspresi alel lokus α -GDP pada masing-masing kelompok dapat ditunjukkan pada Gambar 3. Dari lokus yang terdeteksi alel yang muncul hanya BB dengan beberapa individu tidak terekspresi.

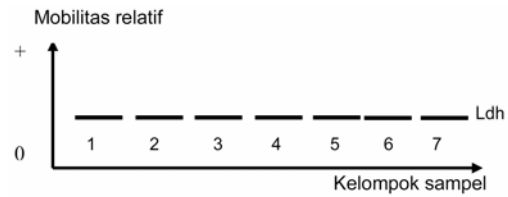


Gambar 3. Perbandingan ekspresi alel lokus α -GDP pada masing-masing kelompok kontrol, tahan terhadap senyawa H_2S maupun kelompok mati oleh adanya senyawa H_2S dengan berbagai variasi konsentrasi

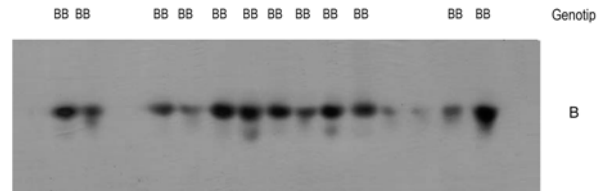
Lactat dehydrogenase (LDH)

Enzim ini terdeteksi dan aktif pada jaringan otot dengan pergerakan ke arah katoda. Semua kelompok sampel udang windu terdapat hanya satu pita tunggal (homozigot), yang dikontrol oleh satu macam alel. Enzim LDH dikode oleh satu lokus, yaitu LDH*. Ekspresi enzim LDH bersifat monomerik dan hal ini menunjukkan tidak adanya keragaman genetik udang windu untuk enzim LDH. Struktur LDH* adalah tetramer. Pola umum diagram *allozyme* LDH* pada jaringan otot udang windu ditunjukkan pada Gambar 4 dengan ekspresi yang bersifat monomorfik pada semua kelompok sebagaimana terlihat pada Gambar 5.

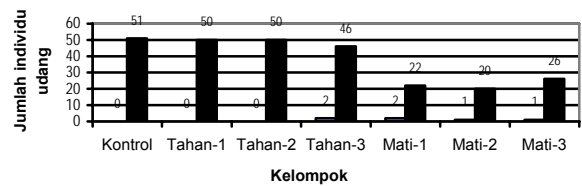
Menurut Lehninger (1982), enzim LDH berperan dalam glikolisis pada keadaan anaerob yang akan menghasilkan laktat. Enzim LDH juga berperan dalam glukogenolisis di otot yang selalu berakhir dengan laktat. Bila dalam keadaan aerob hasil akhir dari glikolisis adalah asam piruvat yang akan masuk ke dalam siklus asam sitrat. Laktat dehidrogenase dapat terdeteksi karena kemampuannya dalam mengkatalisis reduksi piruvat dengan adanya NADH ataupun mengkatalisis oksidasi laktat dengan adanya NAD^+ . Perbandingan ekspresi alel lokus LDH* pada masing-masing kelompok kontrol, tahan terhadap senyawa H_2S maupun kelompok mati oleh adanya senyawa H_2S dengan berbagai variasi konsentrasi ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 4. Zymogram lokus LDH*.



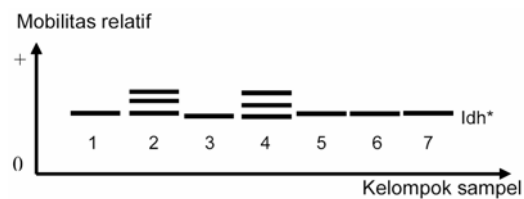
Gambar 5. Ekspresi enzim monomorfik enzim LDH adalah sama pada semua kelompok.



Gambar 6. Perbandingan ekspresi alel lokus LDH* pada kelompok udang windu kontrol, tahan terhadap senyawa H_2S maupun kelompok mati oleh adanya senyawa H_2S dengan berbagai variasi konsentrasi. TM: tak muncul pita; M: muncul pita

Isocitrate dehydrogenase (IDH)

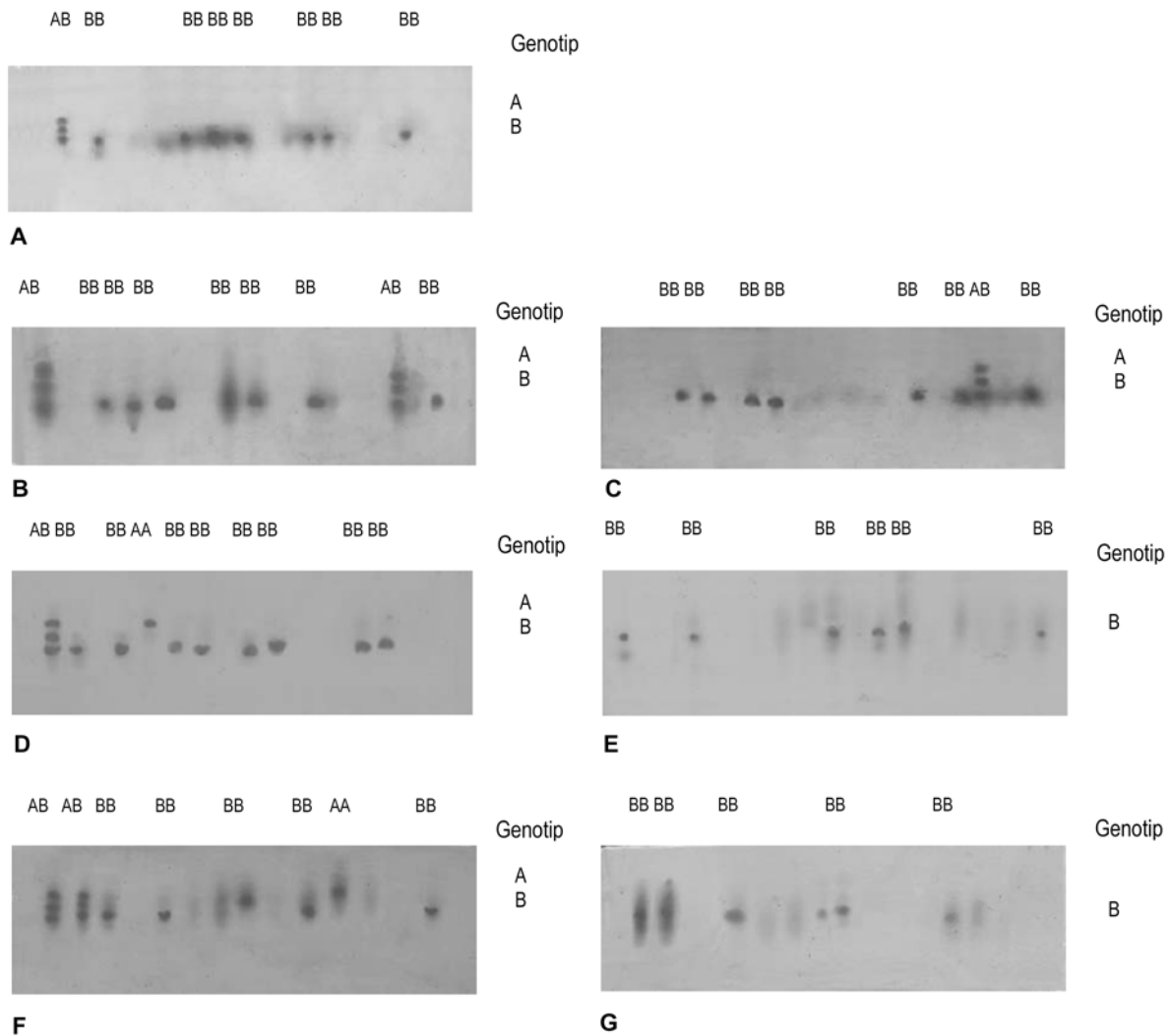
Aktivitas enzim IDH pada jaringan daging dengan mobilitas ke daerah katoda. Hal ini disebabkan oleh muatan negatif karena pengaruh koenzim $NADP$ menjadi $NADPH$. Enzim tersebut dikontrol oleh satu lokus, yaitu IDH* yang bersifat polimorfik, dengan struktur enzim IDH dimer. Ekspresi pola pita ditunjukkan oleh satu lokus heterozygot. Berdasarkan hal-hal tersebut dapat dikatakan bahwa terdapat keragaman genetik untuk enzim IDH pada semua kelompok sampel yang tahan oleh adanya senyawa H_2S . Pola diagram *allozyme* lokus IDH* ditunjukkan pada Gambar 7.



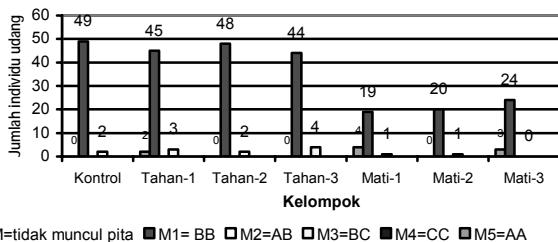
Gambar 7. Zymogram lokus IDH*.

Enzim IDH terlibat dalam reaksi siklus asam sitrat, yaitu mengkatalisis reaksi reversibel antara isositrat dengan oksalosuksinat dan antara oksalosuksinat dengan α -ketoglutarat. Pada reaksi pembentukan oksalo-suksinat dibebaskan $NADPH$ yang akan mengoksidasi ke rantai pernafasan dan menghasilkan 3 ATP (Lehninger, 1982).

Untuk menunjang aktivitas enzim IDH perlu ditambahkan Mn^{2+} . Berdasarkan hal tersebut pada pewarnaan IDH ditambahkan dengan Na_2 , isositrat sebagai substrat, Mn^{2+} sebagai aktivator serta $NADP^+$ sebagai koenzim dan sebagai pewarna. Ekspresi enzim IDH semua kelompok disajikan pada Gambar 8. Perbandingan ekspresi enzim IDH pada individu yang mati oleh senyawa H_2S dalam berbagai konsentrasi ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 8. Ekspresi enzim IDH kelompok kontrol, kelompok tahan terhadap pelakuan H₂S maupun kelompok yang mati oleh karena adanya senyawa H₂S pada berbagai variasi konsentrasi yang ditunjukkan dengan teknik *allozyme* elektroforesis. Keterangan: A. Kontrol, B. Tahan H₂S konsentrasi 0,072 ppm, C. Mati oleh H₂S konsentrasi 0,072 ppm, D. Tahan H₂S konsentrasi 0,092 ppm, E. Mati oleh H₂S konsentrasi 0,092 ppm, F. Tahan H₂S konsentrasi 0,112 ppm, G. Mati oleh H₂S konsentrasi 0,112 ppm



Gambar 9. Perbandingan ekspresi alel lokus IDH pada masing kelompok kontrol, tahan terhadap senyawa H₂S maupun kelompok mati oleh adanya senyawa H₂S dengan berbagai variasi konsentrasi

Pembahasan

Hasil deskripsi lokus dari kedua enzim dapat dihitung jumlah lokus yang terdeteksi pada udang windu dan polimorfisme masing-masing kelompok sampel, seperti tersaji pada Tabel 1. Hasil deskripsi lokus tersebut memperlihatkan bahwa pada kelompok kontrol diperoleh lokus α-GDP* monomorfik pada semua kelompok, sedangkan lokus IDH* diperoleh satu lokus yang polimorfik pada semua kelompok kecuali kelompok M-3 diperoleh satu lokus monomorfik.

Tabel 1. Jumlah lokus dan polimorfisme udang windu dari 7 kelompok sampel

No	Enzim	No lokus	Lokus	Polimorfisme						
				K	T-1	T-2	T-3	M-1	M-2	M-3
1	α-GDP	1	α-GDP*	M	M	M	M	M	M	M
2	LDH	2	LDH*	M	M	M	M	M	M	M
3	IDH	3	IDH*	P	P	P	P	P	P	M

Keterangan: P: polimorfik; M: monomorfik; K: kelompok kontrol; T-1: kelompok udang windu tahan pada konsentrasi 0,072 ppm H₂S; T-2: kelompok udang windu tahan pada konsentrasi 0,092 ppm H₂S; T-3: kelompok udang windu tahan pada konsentrasi 0,112 ppm H₂S; M-1: kelompok udang windu mati pada konsentrasi 0,072 ppm H₂S; M-2: kelompok udang windu mati pada konsentrasi 0,092 ppm H₂S; M-3: kelompok udang windu mati pada konsentrasi 0,112 ppm H₂S.

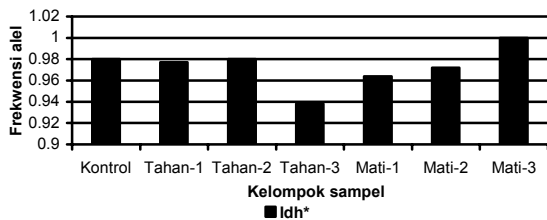
Keragaman genetik

Berdasarkan atas pembacaan pita pada hasil elektroforesis dapat dihitung frekuensi alel pada masing-masing lokus. Hasil pembacaan frekuensi alel tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Frekuensi alel dari lokus polimorfik pada udang windu (*P. monodon*) yang tahan H₂S dan mati.

Lokus	Alel	Kelompok						
		Kontrol	Tahan1	Tahan2	Tahan3	Mati1	Mati2	Mati3
IDH*	100	0,980	0,977	0,980	0,938	0,964	0,972	1,000
	70	0,020	0,023	0,020	0,063	0,036	0,028	0,000

Keterangan: Untuk lokus yang semua kelompok monomorfik tidak dihitung karena nilai $\chi^2 = 0$ yang berarti tidak ada keragaman genetik



Gambar 10. Frekuensi alel-100 pada lokus yang menunjukkan adanya polimorfisme IDH*

Frekuensi alel-100 merupakan alel homozigot, jika frekuensi alel tersebut mendekati 1 maka kemungkinan adanya kontrol dari alel yang lain sangat kecil. Tingginya frekuensi alel-100 dapat dikatakan bahwa populasi tersebut lebih banyak ditemukan individu yang homozigot. Hal ini mengindikasikan bahwa pada populasi dengan perlakuan H₂S yang mati didominasi oleh alel-100 pada semua enzim, sebaliknya pada populasi kontrol dan tahan enzim IDH*. Suatu lokus dianggap polimorfik bila frekuensi dari alel yang paling sering muncul sama atau kurang dari 0,99 (Permana dkk, 2001). Gambaran frekuensi alel-100 pada lokus yang menunjukkan adanya polimorfisme ditunjukkan pada Gambar 10. Heterosigositas pada masing-masing lokus ditampilkan di Tabel 3.

Tabel 3. Heterosigositas udang windu (*P. monodon*) pada lokus IDH* dan α -GDP

Lokus	Heterosigositas teramati (Ho)						
	K	T-1	T-2	T-3	M-1	M-2	M-3
α -GDP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
LDH*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
IDH*	0,041	0,045	0,041	0,125	0,071	0,056	0,000

Populasi dengan keragaman genetik yang tinggi akan memiliki peluang hidup yang semakin tinggi untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Heterosigositas yang tinggi memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksploitasi gen-gen yang menguntungkan. Genotip yang diproduksi oleh alel dominan yang berhubungan dengan penurunan heterosigositas resesif mengakibatkan detrimental yaitu kekurangan enzim esensial fekunditas, penurunan daya hidup atau peningkatan mortalitas, penurunan daya tahan terhadap penyakit dan laju pertumbuhan.

KESIMPULAN

Keragaman genetik kelompok udang windu tahan terhadap senyawa H₂S dapat dianalisis dengan enzim IDH, LDH dan α -GDP menggunakan teknik *allozyme*

elektroforesis, menggunakan jaringan spesifik daging dan *buffer* CAPM pH 6. Dari kedua enzim yang dianalisis dapat terdeteksi bahwa enzim IDH memiliki lokus polimorfik sedangkan enzim α -GDP dan LDH dengan lokus monomorfik. Rata-rata heterozyositas untuk kelompok tahan terhadap senyawa H₂S adalah 0,070, kelompok mati oleh adanya senyawa H₂S sebesar 0,042 sedangkan kelompok kontrol dengan heterozyositas 0,041. Kelompok tahan terhadap senyawa H₂S dengan keragaman genetik yang tinggi akan memiliki peluang hidup yang semakin tinggi untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Heterosigositas yang tinggi memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksploitasi gen-gen yang menguntungkan.

DAFTAR PUSTAKA

Allendorf, F.W and F.M. Utter. 1979. *Population Genetics*. In: Hoar, W.S., D.S Randall, and J.R Brett (eds.). *Fish Physiology*. New York: Academic Press.

Arnawati. 2003. *Studi Morfometrik dan Variasi Genetik Rajungan (Potunus pelagicus Linn 1758) di Perairan Saugi (Sulawesi Selatan), Negara (Bali) dan Cilacap (Jawa Tengah)*. [Tesis]. Makassar: Universitas Hasanudin.

Boyd C.E., 1992. Shrimp pond bottom soil and sediment management. In: Wyban J. (ed.). *Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming World Aquaculture Society*. New York: Baton Rouge LA.

Buwono, I.D., 1993. *Tambak Udang Windu-Sistem Pengelolaan Berpolo Intensif*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Chamberlain, G.W. 1989. *Rethinking Shrimp Pond Management*. Asia Technical Bulletin MC (8) 15/1/89, Vol 3 AQ 14, 89-92, Singapore: American Soybean Association.

Chanratchakool, P., 2003. Problems in shrimp culture during the Wet Season. *Journal Aquaculture Asia* 8 (2): 38-39.

Deviana I, 2004. *Laporan Tahunan 2003-Divisi Technical Service*. Surabaya: PT. CP Prima, Jawa Timur.

FAO FishStat Plu. 2001. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries Department Statistical Database and Software. Version 2.30*. www.fao.org.

Haryanti, S. Ismi, A. Khalik, dan M. Takano. 1993. Penggunaan beberapa jenis saringan air dan sinar ultraviolet untuk pemeliharaan udang windu. *Jurnal Penelitian Budidaya Pantai* 9 (2): 59-68

Haryanti, S.B. Moria, K. Mahardika, dan I.G.Ng. Permana. 2003. *Standart Mutu Benih Udang Penaeus monodon dan Lithopenaeus vannamei melalui Analisis Morfologi dan Rasio RNA/DNA*. [Laporan Teknis]. Gondol Bali: Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut.

Lehninger, A.L., 1982. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers.

Leophairatana A., 2003. *The Controversies of Thailand's Large Shrimp Exports*, February 28: 4-14. www.biotech.or.th/shrimp/documents/ThailandShrimp.pdf

Moria, S.B., Haryanti, K. Mahardika, dan I.G.Ng. Permana. 2003. *Selective Breeding pada Udang Lithopenaeus vannamei dan Penaeus monodon*. [Laporan Teknis]. Gondol Bali: Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut.

Permana, I.G.Ng., S.B. Moria, Haryanti, dan K. Sugama. 2001. Pengaruh domestikasi terhadap variasi genetik pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) yang dideteksi dengan allozyme elektroforesis. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 7 (1): 25-29.

Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.

Sugama, K. dan Prijono. 1998. Biochemical genetic differentiation among wild population of milkfish, *Chanos chanos* in Indonesia. *Indonesia Fishery Research Journal* 4 (1): 11-19

Sugama K, 1993. Penelitian tentang enzim polymorphism pada udang windu *Penaeus monodon*, *Jurnal Penelitian Budidaya Pantai* 9 (2): 147-153

Watson J.D., J. Tooze and D.T Kurtz, 1998. *DNA Recombinant: Suatu Pelajaran Singkat*. Penerjemah: Gunarso, W. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Wibowo, A.H., 2001. *Analisis Variasi Gen dan Struktur Populasi Genetik Ikan Napoleon Wrasse (Cheilinus undulatus Ruppell)*. [Tesis]. Malang: Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya.

Yusoff, F.M., A.T Law, H.Y. Teo, and M.T. Hoque, 1998. Effect of hydrogen sulfide on early developmental stages of javanese carp (*Puntius gonionotus* (Bleeker)). *Asian Fisheries Science* 11: 231-238