

**PROFIL (PANJANG FRAGMENT) DNA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)
YANG TAHAN DAN RENTAN TERHADAP SERANGAN
BAKTERI *Vibrio alginolyticus***

**Asmi Citra Malina, Elmi Nurhaidah Zainuddin
dan Gunarto Latama
E-mail : citramalina@unhas.ac.id**

Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas,
Makassar

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi letal 50 (LC₅₀) dan profil DNA udang windu *Penaeus monodon* yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan menggunakan teknik PCR-RAPD. Udang windu yang digunakan berukuran 10-15 gr yang berasal dari Takalar. Penelitian ini terdiri atas dua tahap yaitu tahap mencari LC₅₀ dan tahap mengetahui profil DNA udang windu yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Parameter yang diamati meliputi ekstraksi dan pengukuran konsentrasi DNA genom dengan menggunakan Kit (Puregene, Minneapolis, USA); analisa PCR-RAPD yang menggunakan 16 jenis primer yang terdiri atas enam primer (RAPD 1-6) merupakan primer Kit RAPD (RAPD Analysis Primers Sets, Amersham Pharmacia Biotech, Cat. no.: 27-9501-01), primer OPA-14, primer-A, -B, -C, dan -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457; elektroforesis dan sebagai data penunjang dilakukan pengukuran kualitas air.

Dari hasil penelitian diperoleh nilai LC₅₀ adalah 10^{5.87} Cfu/ml yang selanjutnya diperoleh udang yang tahan dan rentan terhadap bakteri *V. Alginolyticus*. Hasil konsentrasi DNA yang diperoleh yaitu terendah 448 µg/ml dan yang tertinggi 3320 µg/ml. Adapun nilai kemurnian yang diperoleh cukup tinggi yaitu berkisar 86 – 95 %. Dari 16 primer yang dicobakan hanya 6 primer yang menghasilkan pola pita yaitu primer OPA-14, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457, akan tetapi yang menghasilkan pita yang paling banyak dan jelas adalah primer UBC-122. Dari pola pita tersebut dihasilkan jumlah rata-rata pita DNA produk PCR dari udang yang tahan (6,4 buah fragmen) lebih besar daripada udang yang mati (4,9 buah fragmen). Sedangkan persentase kelompok udang hidup yang memiliki fragmen DNA dengan panjang antara 1,5 dan 2 kb yaitu 57% (4 sampel) lebih banyak daripada kelompok udang yang mati ada satu sampel (14%). Kelompok udang hidup yang memiliki pita DNA tersebut adalah pada kolom no. 1, 5, 6, dan no.7, sementara dari kelompok udang yang rentan adalah kolom no. 11. Secara umum pola pita DNA udang yang tahan memiliki fragmen DNA kandidat penanda yaitu 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; dan 2,0 kb. Ketiga ekor udang windu sisanya (kolom no. 2, 3, dan 4) dari kelompok udang windu tahan juga memiliki pola pita DNA sama dengan ukuran panjang fragmen yang terdiri dari 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,2 dan 1,5 kb. Adapun pola pita DNA udang yang rentan umumnya mempunyai ukuran fragmen 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,2 kb. Dengan

demikian, pita DNA khas dengan panjang antara 1,5 dan 2 kb berpotensi menjadi marker udang windu asal Takalar yang resisten bakteri patogen.

Kata kunci : Profil DNA, *Penaeus monodon*, *V. alginolyticus*, PCR, RAPD

PENDAHULUAN

Udang ditetapkan sebagai salah satu komoditas perikanan yang harus ditingkatkan produksinya, karena udang merupakan primadona ekspor hasil perikanan Indonesia yang usaha budidayanya telah terbukti memiliki *backward* dan *forward linkage* yang cukup luas bagi aktivitas ekonomi masyarakat. Menurunnya aktivitas usaha budidaya udang di beberapa sentra produksi beberapa tahun terakhir ini, telah membawa dampak yang cukup signifikan bagi menurunnya pertumbuhan ekonomi masyarakat di beberapa kawasan budidaya tersebut.

Berbagai permasalahan telah muncul dalam budidaya udang di tambak, diantaranya: penurunan kualitas lingkungan serta timbulnya hama dan penyakit. Beberapa faktor kemungkinan penyebab serangan penyakit pada udang adalah sistem teknologi budidaya udang selama ini tidak sesuai atau kurang ketelitian dalam pemilihan lokasi, kesalahan konstruksi dan strukturisasi, dan penebaran benih terlalu jauh melampaui kapasitas daya dukung lingkungan.

Penyakit yang banyak ditemukan di tambak adalah vibriosis (penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio*). Selain itu penyakit ini juga banyak menyerang udang di panti-panti pembenihan (hatchery). *Vibrio alginolyticus* umumnya ditemukan di tambak-tambak dan *V. harveyi* merupakan penyebab utama kematian udang di panti pembenihan. Selain vibriosis, penyakit virus juga merupakan salah satu penyebab kerugian bagi usaha budidaya udang di Indonesia bahkan hingga saat ini penyakit virus khususnya penyakit virus bintik putih yang disebabkan oleh White Spot Syndrome Virus (WSSV) merupakan salah satu penyebab utama kematian udang windu di tambak-tambak di Indonesia. Oleh karena itu pencegahan dan perluasan penyakit, khususnya yang disebabkan oleh bakteri pathogen perlu dilakukan secara dini dan membutuhkan penanganan yang tepat.

Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan cara pemberian vaksin (Tizard, 1988; Anderson, 1974; Ellis, 1988, Witteveldt *et al.*, 2004), disamping itu penggunaan imunostimulan dan probiotik dapat dijadikan alternatif sebagai upaya perlindungan terhadap serangan penyakit (Robertson *et al.*, 1990; Anderson, 1992, Effendy *et al.*, 2004, Zar *et al.*, 2006). Selain itu, cara lain yang dapat ditempuh yaitu dengan melakukan perbandingan mutu genetik udang melalui seleksi maupun rekayasa genetika. Salah satu hal yang dapat dilakukan untuk mempermudah dalam pengambilan kebijaksanaan untuk menentukan metode pengendalian penyakit udang windu yang lebih cepat dan akurat adalah melalui penelusuran model transmisi penyakit pada budidaya udang windu melalui teknik sidik jari DNA (Sulaeman *et al.*, 2003). Metode rekayasa genetik yang lain dapat dilakukan melalui kloning DNA (gen) untuk mendapatkan strain udang yang tahan terhadap serangan penyakit. Untuk itu dibutuhkan penelitian ditingkat molekuler dan sebagai langkah awal diperlukan pengetahuan tentang profil dan ekspresi gen udang yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri pathogen.

Sampai saat ini belum ada penelitian mengenai gambaran profil DNA udang windu yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri *V.alginolyticus*. Oleh karena itu, penelitian ini yang mencakup penelitian bidang imunologi dan genetik atau imunogenetik memiliki tujuan yaitu untuk melihat profil (polimorfisme) DNA udang windu (*Penaeus monodon*) yang tahan dan rentan terhadap serangan bakteri *V.alginolyticus*. Dengan demikian, akan didapatkan marker yang dapat dijadikan gambaran marker udang windu yang tahan terhadap serangan *V.alginolyticus*. Dengan marker tersebut petani dapat dengan mudah menentukan udang windu yang harus dipelihara untuk menghasilkan benih yang akan dibudidayakan dan dapat pula digunakan dalam program produksi udang windu unggul.

METODE PENELITIAN

Udang yang digunakan adalah udang windu (*Penaeus monodon*) yang diperoleh dari Balai Riset Budidaya Air Payau Takalar (Sul-Sel). Udang windu dengan ukuran 10-15 gr terlebih dahulu diadaptasikan selama satu bulan. Bakteri yang digunakan untuk ujiantang dalam penelitian ini adalah bakteri *Vibrio alginolyticus* yang diperoleh dari Balai Riset Air Payau Takalar.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap mencari lethal konsentrasi 50% (LC₅₀) dan tahap analisis panjang fragmen DNA. Tahap pertama terdiri dari tiga uji yaitu uji pendahuluan yang terdiri atas konsentrasi bakteri untuk ujiantang 10², 10³, 10⁴, 10⁵ dan 10⁶ CFU/mL secara perendaman; uji konsentrasi letal yang terdiri dari 10⁴, 10⁵ dan 10⁶ CFU/mL dan uji LC₅₀. Parameter yang diamati meliputi ekstraksi dan pengukuran konsentrasi DNA, analisis PCR-RAPD (Tingey *et al.*, 1992 dan Hartana, 2004), elektroforesis dan sebagai data penunjang diukur kualitas air. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan Kit (Puregene, Minneapolis, USA). Konsentrasi DNA diukur menggunakan mesin kuantifikasi DNA/RNA. Untuk metode PCR-RAPD tahap awal menggunakan 16 jenis primer yang terdiri atas enam kit RAPD (RAPD Analysis Primers Sets, Amersham Pharmacia Biotech, Cat. no.: 27-9501-01), dan sisanya adalah primer OPA-14, primer-A, -B, -C, dan -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457. Tahap selanjutnya dipilih salah satu primer yang menghasilkan pita DNA dengan panjang bervariasi dan jelas terlihat. Amplifikasi PCR dilakukan dengan volume reaksi 15 µl yang mengandung 1x *Ex Taq* Buffer, 200µM dNTP mix, *Ex Taq* polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) 0,125U, 1 µl DNA, dan 1,5 µl primer. Program PCR memiliki 40 siklus dengan denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 30°C, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit. Sebanyak 5 µl reaksi dielektroforesis menggunakan gel agarose 0,7%, DNA divisualisasi dengan etidium bromida yang disinari dengan UV. Pemotongan fragment DNA tersebut dielektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%, dan divisualisasi dengan etidium bromida yang disinari dengan lampu UV. Hasil gandaan DNA dianalisis dari elektroferogram hasil PCR.

Perhitungan penentuan dosis letal (LC₅₀) menggunakan analisis probit berdasarkan Bushine-Nash (Koestoni, 1985). Untuk analisis profil DNA dilakukan dengan menjumlahkan pita DNA hasil amplifikasi PCR lalu dirata-ratakan dengan semua sampel dari masing-masing kelompok udang yang hidup (T) dan yang rentan (M) setelah ujiantang dengan bakteri *V.alginolyticus*. Perbedaan jumlah rata-ratan dan

pola pita DNA hasil amplifikasi PCR dianalisis secara deskriptif. Begitu pula dengan analisis kualitas airnya dilakukan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Lethal Concentration 50 (LC₅₀)

Uji pendahuluan untuk mendapatkan LC₅₀ digunakan konsentrasi 10², 10³, 10⁴, 10⁵, dan 10⁶ CFU/mL. Dari uji pendahuluan ini didapatkan tiga konsentrasi bakteri *V.alginolyticus* yang menyebabkan kematian yaitu 10⁴, 10⁵, dan 10⁶ CFU/mL. Selanjutnya dari hasil uji ke tiga konsentrasi diperoleh data pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Rata-rata dan Respons Kumulatif Udang Windu yang Tahan (Hidup) dan Rentan (Mati) Setelah Uji tantang

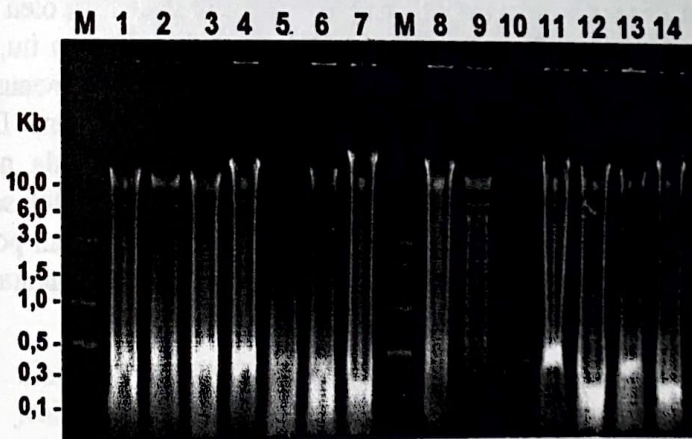
Kepadatan Bakteri (CFU/mL)	Respons		Kumulatif		Ratio	% Kematian
	Mati	Hidup	Mati	Hidup		
10 ⁶	3	3	6	3	6/9	66,67
10 ⁵	2	4	3	7	3/10	30,0
10 ⁴	1	5	1	12	1/13	7,69

Hasil analisis probit dari data tersebut diperoleh nilai LC₅₀ adalah 10^{5,87} CFU/mL yang selanjutnya dilakukan uji tantang pada udang windu sejumlah 20 ekor dengan jumlah udang windu yang mati 11 dan hidup sebanyak 9 ekor .

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dianalisis profil DNA udang yang tahan (hidup) dan yang rentan (mati) masing-masing sebanyak 7 ekor.

Panjang Fragmen DNA

Hasil ekstraksi DNA udang windu yang tahan (hidup) dan yang rentan (mati) setelah uji tantang, masing-masing 7 ekor, ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforesis DNA yang diekstraksi dari organ haemolymph udang windu yang tahan (no. 1-7) dan yang rentan (no. 8-14) setelah diuji tantang dengan bakteri *V.alginolyticus*. M: penanda dengan panjang DNA ditunjukkan di sebelah kiri gambar dalam unit kilobase (kb).

Visualisasi DNA pada gel agarose memperlihatkan memperlihatkan bahwa bentuk dan ukuran DNA total pada udang yang tahan (kolom 1-7) dan rentan (kolom 8-14) hampir sama yaitu lebih dari 10 kb yang menunjukkan bahwa pada semua perlakuan kemurniannya tidak jauh berbeda yaitu berkisar 86-95% (Tabel 2). Konsentrasi DNA hasil ekstraksi disamakan menjadi 488 µg/ml sebagai cetakan dalam proses PCR.

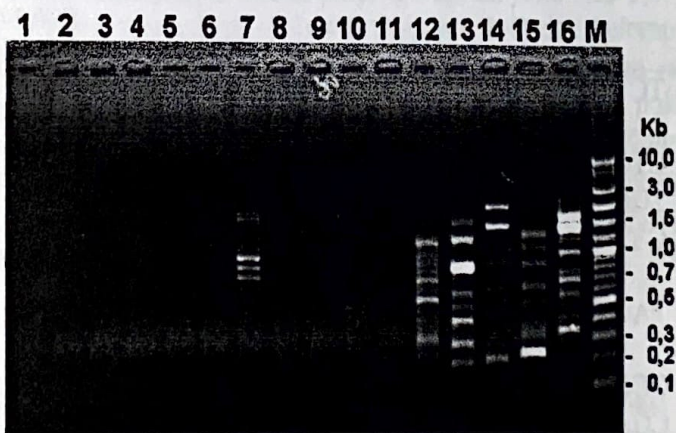
Hasil konsentrasi DNA yang diperoleh yaitu terendah 448 µg/ml dan yang tertinggi 3320 µg/ml. Adapun nilai kemurnian yang diperoleh cukup tinggi yaitu berkisar 86-95%. Hal ini menandakan bahwa DNA yang diekstrak dalam kondisi utuh. Kemurnian DNA dan keutuhannya sangat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi PCR khususnya PCR-RAPD. Apabila DNA cetakan tidak murni akan mengganggu penempelan primer pada situsnya dan akan menghambat aktivitas enzim polimerase DNA (*DNA polymerase*). DNA cetakan yang banyak mengalami fragmentasi dapat menghilangkan situs penempelan primer (Runtunuwu *et al.*, 2004).

Pada tahap awal, sampel DNA udang windu yang tahan (hidup) dan rentan (mati) diuji dengan menggunakan 16 jenis primer yang terdiri dari enam primer (RAPD 1-6) merupakan primer kit RAPD (RAPD Analysis Primers Sets, Amersham Pharmacia Biotech, Cat. no.: 27-9501-01), selebihnya menggunakan primer OPA-14, primer-A, -B, -C, dan -D, YNZ 22, UBC-122, -158, -456, dan -457 untuk mengetahui jenis primer yang menghasilkan jumlah pita DNA yang banyak dan jelas terlihat (Gambar 2). Seperti ditunjukkan pada Gambar 2 bahwa tidak semua primer tersebut (kolom 1-6; 8-11) dapat melekat atau *annealing* ke DNA genom sehingga tidak semua proses PCR menghasilkan pita DNA. Hal ini dapat disebabkan karena antara primer-primer tersebut dengan DNA cetakan (*template DNA*) tidak terdapat kesamaan urutan basa diantara keduanya, karena apabila terdapat kesamaan urutan basa diantara keduanya maka primer akan menempel pada ke dua utas DNA cetakan di dua situs (*sites*) yang berbeda. Kalau ke dua situs penempelan primer berada dalam jarak yang dapat diamplifikasi maka akan diperoleh produk PCR berupa pita DNA (Tingey *et al.*, 1992; Sambrook *et al.*, 1989). Didukung oleh pernyataan Tingey *et al.* (1992) bahwa keberhasilan suatu primer mengamplifikasi DNA cetakan ditentukan oleh ada tidaknya homologi sekuens nukleotida primer dengan DNA cetakan. Selain itu, pada sumur yang memiliki pita DNA yang jelas terlihat (kolom no. 7, 12-16) menunjukkan pola yang bervariasi antar primer, mengindikasikan spesifisitas sekuens DNA tempat masing-masing primer tersebut melekat. Adapun sekuens daripada primer-primer tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Pada proses PCR selanjutnya untuk semua sampel digunakan primer UBC-122 karena primer inilah yang menghasilkan pola pita yang sangat jelas dan paling banyak yaitu 8 pita DNA yang terang dengan ukuran 0,15; 0,25; 0,4; 0,45; 0,5; 0,8; 1,2 dan 1,5 kb (kolom no. 13 pada Gambar 2).

Tabel 2. Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dari organ haemolymph udang windu yang tahan (T) dan rentan (M) setelah diuji tantang dengan bakteri *V.alginolyticus*.

Kode Sample	[DNA] hasil pengukuran	[DNA] hasil ekstraksi (µg/ml)*	Rasio	Kemrnian (%)
T1	21,7	868	1,823	91
T2	18,4	736	1,733	86
T3	12,2	488	1,904	95
T4	33,6	1344	1,868	93
T5	78,0	3120	1,818	90
T6	77,2	3088	1,734	86
T7	83,0	3320	1,825	91
M1	44,4	1776	1,830	91
M2	26,4	1056	1,788	89
M3	51,6	2064	1,818	90
M4	35,9	1436	1,830	91
M5	63,1	2524	1,725	86
M6	55,7	2228	1,792	89
M7	62,0	2480	1,835	91

*) Konsentrasi DNA hasil ekstraksi dihitung dengan mengalikan konsentrasi DNA hasil pengukuran dengan faktor pengenceran, yaitu 40.



Gambar 2. Elektroforesis DNA produk PCR-RAPD dengan primer berbeda, 16 jenis primer (no. 1-16), menggunakan DNA sampel udang windu yang tahan (hidup) dan rentan (mati) setelah uji tantang. M: penanda dengan panjang fragmen DNA ditunjukkan di sebelah kanan gambar dalam unit kilobase (kb).

Hasil elektroforesis produk PCR menggunakan primer UBC-122 untuk semua sampel ditunjukkan pada Gambar 3, sedangkan jumlah pita DNA yang dihasilkan masing-masing sample dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 3. Elektroforesis DNA produk PCR-RAPD udang windu yang tahan/hidup (no. 1-7) dan yang rentan/mati (no. 8-14) setelah diuji tantang dengan bakteri *V.alginolyticus*. Proses PCR menggunakan primer UBC-122. M: penanda dengan panjang fragmen DNA ditunjukkan di sebelah kiri gambar dalam unit kilobase (kb).

Tabel 3. Sekuens DNA Primer yang menghasilkan Pola Pita DNA

Jenis Primer	Sekuens DNA	Sumber Pustaka	Jumlah pita yang dihasilkan	Letak pada kolom
OPA-14	TCT GTG CTG G	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	4	7
YNZ-22	CTC TGG GTG TCG TGC		4	12
UBC-122	GTA GAC GAG C	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	8	13
UBC-158	TAG CCG TGG C	Khetpu <i>et al.</i> (2005)	5	14
UBC-456	GCG GAG GTC C		5	15
UBC-457	CGA CGC CCT G	Diaz <i>et al.</i> (2007)	6	16

Tabel 4. Jumlah dan Rata-rata Pita DNA udang windu yang tahan (T) dan Rentan (M)

Kode Sample Udang Tahan (T)	Jumlah Pita DNA	Kode Sampel Udang Rentan (M)	Jumlah Pita DNA
T1	5	M1	5
T2	7	M2	4
T3	7	M3	2
T4	8	M4	7
T5	6	M5	5
T6	6	M6	6
T7	6	M7	5
Jumlah	45		34
Rata-rata	6,4		4,9

Pola pita DNA produk PCR pada grup udang windu yang tahan (hidup) secara umum berbeda dengan yang rentan (mati) setelah ujiantang. Adapun jumlah rata-rata pita DNA produk PCR dari udang windu yang hidup 6,4 buah fragmen lebih besar daripada udang yang mati 4,9 buah fragmen (Tabel 4). Selain itu, persentase kelompok udang hidup yang memiliki fragmen DNA dengan panjang antara 1,5 dan 2 kb yaitu 57% (4 sampel) lebih banyak daripada kelompok udang yang mati ada satu sampel (14%). Kelompok udang hidup yang memiliki pita DNA tersebut adalah pada kolom no. 1, 5, 6 dan no.7, sementara dari kelompok udang yang mati adalah kolom no. 11. Dengan demikian, fragmen DNA tersebut berpeluang besar menjadi salah satu penanda (marker) bagi udang windu macan resisten terhadap bakteri *V.alginolyticus*. Selanjutnya, secara umum pola pita DNA udang yang memiliki fragmen DNA kandidat penanda tersebut adalah sama dengan ukuran panjang fragmen yaitu 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; dan 2,0 kb. Ketiga ekor udang sisanya (kolom no. 2-4) dari kelompok udang hidup juga memiliki pola pita DNA sama dengan ukuran panjang fragmen yang terdiri dari 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,2 dan 1,5 kb. Hal ini mungkin bisa pula menjadi pembeda antara udang windu macan yang resisten terhadap bakteri *V.alginolyticus* dengan udang yang rentan, meskipun terdapat 1 ekor dari kelompok udang yang rentan tersebut memiliki pola yang sama dengan udang yang resisten. Adapun pola pita DNA udang yang rentan umumnya mempunyai ukuran fragmen 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,2 kb.

Kualitas Air

Rataan kualitas air yang diperoleh selama penelitian tertera pada Tabel 5. Secara umum kualitas air yang diperoleh masih berada dalam kisaran yang bisa ditolerir oleh udang windu. Disamping itu, adanya filterisasi pada setiap penggantian air sehingga air yang digunakan bebas dari hama dan bakteri patogen khususnya *V.alginolyticus* sehingga dapat diyakini bahwa udang windu yang rentan (mati) mumi disebabkan oleh hasil ujiantang bakteri *V.alginolyticus*.

Menurut Subyakto (2003), kisaran kualitas air yang layak untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan udang windu seperti suhu 28-32°C, salinitas 28-35 ppt, amoniak < 0,01 ppm dan oksigen terlarut >3 ppm. Dengan demikian berdasarkan hasil pengukuran kualitas air, kisaran yang didapat masih layak untuk sintasan dan

pertumbuhan udang windu seperti suhu 28°C, salinitas 31 ppt, amoniak 0 ppm dan oksigen terlarut antara 3,06-3,07 ppm dan pH 7-8.

Tabel 5. Rataan Kualitas Air Udang Windu Selama Penelitian

Konsentrasi bakteri (CFU/ml)	Parameter (Satuan)				
	Suhu (°C)	Salinitas (‰)	NH ₃ (ppm)	DO (ppm)	pH
Kontrol (A)	28	31	0	3,06	7
10 ⁴	28	31	0	3,07	8
10 ⁵	28	31	0	3,07	8
10 ⁶	28	31	0	3,07	8

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan beberapa hal diantaranya konsentrasi bakteri *V.alginolyticus* yang mematikan sebanyak 50 % (LC₅₀) udang windu macan adalah 10^{5,87} CFU/mL. Pola pita DNA produk amplifikasi PCR dengan metode RAPD antara udang yang tahan dan yang rentan setelah uji tantang adalah berbeda. Jumlah rata-rata pita DNA hasil amplifikasi PCR untuk udang yang tahan 6,4 buah fragmen lebih tinggi dibandingkan pada udang yang rentan 4,9 buah fragmen. Sebanyak 57% dari udang yang hidup memiliki pita DNA khas dengan panjang antara 1,5 dan 2 kb, dan pita DNA tersebut berpotensi menjadi marker udang windu resisten bakteri patogen. Kualitas air dalam kisaran layak untuk kelangsungan hidup udang windu.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschus, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403-410.
- Anderson, D.P. 1974. *Fish Immunology*. TFH Publication. Ltd. Hongkong.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, Adjuvants and Vaccines Carrier in Fish. *Applications to Aquaculture. Annual Review of Fish Diseases* 21 : 281- 307.
- A.R. Tassakka, A.C.M., dan M. Sakai. 2004. Expression of immune-related genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after stimulation by CpG oligodeoxynucleotides. *Aquaculture*, 242 : 1 – 12.
- Diaz, F.A., A.S. Souza dan W.F. Molina. 2007. Lack of interpopulation genetic structure in the genus *stegastes* (Perciformes) with indication of local introgression. *Genetics and Molecular Research*. 6 (4) : 1097 -1106.
- Ellis. A. E. 1988. *Fish Vaccination. 1. General Principles of Fish Vaccination*. Academic Press. London.
- Effendie, I.M. 1979. *Metode Biologi Perikanan*. Yayasan Dewi Sri. Bogor.
- Effendy, S., Rantetondok, A., Tahir, A., 2004. Peningkatan Haemosit Benur Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricius) Pasca Perendaman Ekstrak Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) Pada Konsentrasi Yang Berbeda. *J. Sains & Teknologi*, Vol. 4 No.2: 46-53.
- Hartana, A., 2004. Penggunaan Teknik Molekular untuk Mengidentifikasi dan Melestarikan Keragaman Genetika Plasma Nutfah Tumbuhan. *Dalam : Buku Panduan dan Kumpulan Modul. Pelatihan Identifikasi Keragaman Hayati melalui Teknik molekular dalam Upaya Plasma Nutfah*. Kerjasama antara Pusat studi Ilmu Hayati. LP2M. IPB dengan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. Bogor. Hal 30
- Khetpu, K., S. Wongphayak, S. Klinbunga dan P. Menasveta. 2005. Genetic Diversity and Species – Specific Markers of the Blue Swimming Crab *Portunus Pelagicus*. *In : 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology*. 7 p
- Koestoni, T. 1985. Analisis Probit. Pendugaan LD50 dan LC 50 Serta Metode Perhitungannya. Kelompok Peneliti Hama. Balai Penelitian Hortikultura Lembang. Lembang. 59 hal.
- Kono, T., M. Sakai, and S.E. LaPatra. 2000. Expressed sequence tag analysis of kidney and gill tissues from Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Mar. Biotechnol.*, 2 : 493 – 498.
- Kono, T., and M. Sakai. 2001. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected with the immunostimulant peptidoglycan. *J. Fish and Shellfish Immunol.*, 11 : 357 – 366.
- Robertson, B., G. Rostarad, R. Engstad, and J. Raa. 1990. Enhancement of non specific diseases resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. of Fish Diseases*, 13 : 391 – 400.
- Runtunuwu, S.D, A. Hartana dan Suharsono, 2004. Teknik RAPD Kelapa dan Metode Ekstraksi DNA dan Kit PCR yang Berbeda. *Dalam : Buku Panduan dan Kumpulan Modul Pelatihan Identifikasi Keragaman Hayati Melalui Teknik*