

KARAKTERISASI BIOKIMIA ENZIMATIS EMPAT POPULASI IKAN MAS MENGGUNAKAN METODE ELEKTROFORESIS

Didik Ariyanto¹⁾, Estu Nugroho²⁾, dan Subagyo²⁾

ABSTRAK

Suatu penelitian untuk mengetahui karakter genetik populasi ikan mas telah dilakukan dengan menggunakan metode elektroforesis protein. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Ikan, Pasar Minggu-Jakarta pada bulan November s.d. Desember 2002. Sampel ikan sebanyak 80 ekor mewakili 4 populasi ikan mas (majalaya, rajadanu, wildan, dan sutisna). Jaringan yang diambil untuk pengamatan karakter genetik adalah jaringan otot. Sebagai media elektroforesis digunakan gel pati. Sistem enzim dan protein yang digunakan sebanyak 12 macam. Hasil analisis menunjukkan terdapat 3 lokus polimorfik dari 7 lokus yang teridentifikasi, yaitu Ldh-1, Mdh-1, dan Me. Nilai heterosigositas rata-rata populasi majalaya sebesar 0,216 lebih tinggi daripada ketiga populasi lainnya yang bernilai 0. Hasil analisis *cluster* membagi 4 populasi ikan mas ke dalam 2 kelompok. Populasi rajadanu, wildan, dan sutisna dalam 1 kelompok sedangkan populasi majalaya ke dalam kelompok yang lain dengan nilai perbedaan jarak genetik sebesar 0,0018.

ABSTRACT: *Biochemical characterization of four common carp populations by electrophoresis method. By: Didik Ariyanto, Estu Nugroho, and Subagyo*

A research with the aim to describe the genetic characters of 4 populations in common carp was conducted by using protein electrophoresis method. Total of 80 samples were representing 4 populations i.e. majalaya, rajadanu, wildan, and sutisna. The samples were taken from Research Institute for Freshwater Fisheries (RIFF), Sukamandi. Protein samples have been extracted from muscle. Potato starch gel was used as electrophoresis media. Twelve enzymes and proteins system were used. The result showed that 3 of 7 loci were polymorphism i.e.: Ldh-1, Mdh-1, and Me. Population of majalaya has 0.216 of average heterozygosity higher than 3 other collections. The cluster analysis described as dendrogram, formed 2 groups, population of rajadanu, wildan, and sutisna as one group and populations of majalaya as the one, other with genetic distance of about 0.0018.

KEYWORDS: *biochemical characterization, common carp, electrophoresis*

PENDAHULUAN

Ikan mas (*Cyprinus carpio*) merupakan komoditas yang cukup banyak diproduksi oleh pengguna (pembudi daya) pada luasan hampir di seluruh wilayah Indonesia dan telah memberikan kontribusi ekonomi cukup besar. Hal ini tercermin dari angka produksi ikan mas yang menduduki urutan pertama dari produksi ikan hasil budi daya air tawar pada skala nasional selama kurun waktu 1992--1997. Pada tahun 1997, produksi ikan mas mencapai 146.672 ton atau setara dengan 54,18% dari jumlah produksi perikanan yang ada di Indonesia (Anonim, 1999). Sedangkan pada skala internasional, pada tahun 1995 produksi ikan mas Indonesia menduduki urutan kedua setelah China (FAO, 1997).

Namun demikian, ikan mas yang berkembang di masyarakat pembudi daya saat ini diduga telah

mengalami degradasi kualitas genetik yang menyebabkan kualitas genetiknya rendah (Hadadi, 1999). Rendahnya kualitas genetik ikan dicirikan dengan lambatnya laju pertumbuhan, matang kelamin di usia muda, dan kematian tinggi akibat daya tahan tubuh menurun (Matricia, 1990; Gustiano, 1994; Hardjosubroto, 1994; Maskur *et al.*, 1996; Gustiano *et al.*, 1998).

Salah satu alternatif terbaik untuk mengatasi permasalahan penurunan kualitas genetik adalah melalui upaya pemuliaan. Teknik pemuliaan ikan air tawar yang saat ini banyak dikembangkan di negara-negara maju adalah teknik seleksi. Tahap dasar program seleksi adalah pengenalan karakter baik yang bersifat morfologis, fisiologis, maupun secara kimiawi terhadap komoditas yang diseleksi. Program seleksi pada ikan mas di Indonesia dimulai dari karakterisasi potensi reproduksi 20 strain ikan mas yang berasal

¹⁾ Peneliti pada Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar, Sukamandi

²⁾ Peneliti pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Bogor

dari Pulau Jawa dan Bali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain ikan rajadanu, wildan, dan sutisna berpotensi untuk dikembangkan (Nugroho & Wahyudi, 1991; Hardjamulia *et al.*, 1996). Selain itu, ikan mas majalaya yang telah digunakan oleh masyarakat luas mempunyai potensi dan sangat baik untuk dikembangkan.

Penelitian lanjutan yang dilakukan Imron *et al.* (2000) telah menghasilkan informasi keragaman morfometrik pada keempat strain ikan mas tersebut yang sedikit banyak menggambarkan keragaman genetiknya. Hasil penelitian tersebut perlu diverifikasi melalui pengujian secara biokimiawi untuk mendapatkan informasi mengenai keragaman genetik yang lebih akurat. Hal ini perlu dilakukan karena fenotip suatu individu dipengaruhi oleh faktor genetik, lingkungan, serta interaksi antara faktor genetik dan lingkungan (Tave, 1996).

Salah satu metode pengujian biokimiawi yang sudah digunakan secara luas adalah dengan menggunakan metode elektroforesis protein. Metode ini banyak digunakan dalam identifikasi struktur populasi dan strain dari berbagai jenis ikan seperti yang dilakukan Eknath *et al.* (1991) pada ikan tilapia (*Oreochromis niloticus*), Soewardi (1995) pada ikan gurami (*Osphronemus gouramy*), dan Taniguchi *et al.* (1990) pada ikan spesies *trheespine stickleback* (*Gasterosteus aculeatus*) dari Jepang. Pada ikan mas (*C. carpio*), metode serupa juga sudah dilakukan antara lain oleh Sumantadinata & Taniguchi (1992) yang membandingkan keragaman genetik ikan mas yang berasal dari Indonesia dan dari Jepang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik ikan mas strain majalaya, rajadanu, wildan, dan sutisna untuk tujuan pemuliaannya. Hasil penelitian ini digunakan sebagai dasar untuk menentukan arah dan metode pemuliaan yang akan dilakukan pada tahap selanjutnya dalam rangka mendapatkan ikan mas yang lebih baik, terutama pada karakter pertumbuhannya.

BAHAN DAN METODE

Ikan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 populasi ikan mas hasil pemijahan di Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBPAT), Sukamandi. Induk yang dipijahkan merupakan ikan koleksi hidup LRPTBAT, Sukamandi sebanyak 24 ekor, terdiri atas 12 ekor jantan dan 12 ekor betina yang mewakili 4 strain yaitu strain majalaya, rajadanu, wildan, dan sutisna. Larva hasil pemijahan dipelihara secara terpisah berdasarkan masing-masing strain. Uji kimiawi dilakukan pada benih yang berumur 2 bulan dengan panjang berkisar antara 10--15 cm dan bobot rata-rata 10 g per ekor. Jumlah

sampel ikan sebanyak 20 ekor diambil dari tiap-tiap populasi yang mewakili keempat strain, sehingga total sampel ikan yang dipakai sebanyak 80 ekor.

Metode penelitian yang digunakan adalah dengan metode elektroforesis enzim secara horizontal mengikuti Taniguchi & Sugama (1990). Jaringan yang dipakai sebagai bahan ekstraksi adalah jaringan otot. Dua belas macam sistem enzim dan protein digunakan untuk mengidentifikasi variasi genetik pada masing-masing populasi. Kedua belas macam sistem enzim dan protein tersebut adalah Lactate dehydrogenase (Ldh), Superoxide dismutase (Sod), Sorbitol dehydrogenase (Sdh), Malate dehydrogenase (Mdh), Isocitrate dehydrogenase (Idh), Aspartate dehydrogenase (Adh), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-Pgd), Glucose-6-Phosphate dehydrogenase (G-6-Pdh), Protein total (Pt), Maleic enzim (Me), Xantophil dehydrogenase (Xdh), dan b-Galactosidase (b-Gal). Sebagai media elektroforesis digunakan gel yang dibuat dari suspensi tepung kentang dengan konsentrasi 12% yang dihidrolisis, sedangkan sebagai larutan penyangga (*buffer*) digunakan Triss citric acid pH 6,3 (TC-6,3). *Running* dilakukan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$, selama 3--4 jam dengan arus listrik sebesar 48 mA. Visualisasi pita hasil migrasi elektroforesis dilakukan dengan pewarnaan histokimia dan pewarna protein umum (non-spesifik). Selanjutnya gel diinkubasi pada suhu 50°C , hingga pita-pita migrasi protein hasil elektroforesis terlihat jelas. Fiksasi menggunakan larutan campuran antara asam asetik glacial 10% dan gliserine 10%. Penomoran lokus dan alel menggunakan sistem nomenklatur menurut Shaklee *et al.* (1990).

Hasil *running* yang berupa zimogram hasil elektroforesis enzim kemudian diinterpretasi sehingga didapatkan data frekuensi alel. Selanjutnya data tersebut digunakan untuk menghitung beberapa parameter struktur genetik populasi yang meliputi derajat polimorfisme (*degree of polymorphism*) (Leary & Booke, 1990), heterozigositas rata-rata (*average heterozygosity*), dan jarak genetik (*genetic distance*) (Nei, 1972 dalam Takezaki & Nei, 1996). Analisis cluster dalam bentuk dendrogram dilakukan untuk mengelompokkan keempat populasi ikan mas berdasarkan nilai jarak genetik dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) (Sokal & Rohlf, 1981).

HASIL DAN BAHASAN

Hasil

Hasil analisis elektroforesis yang diperlihatkan dalam bentuk zimogram menunjukkan bahwa dari 12 enzim dan protein yang digunakan dapat diidentifikasi

7 lokus, 3 di antaranya polimorfik ($P_{0,95}$) yaitu, Ldh-1, Mdh-1, dan Me (Tabel 1). Pada penelitian ini lokus yang bersifat polimorfik hanya terlihat pada populasi majalaya, sedangkan lokus pada ketiga populasi lainnya bersifat monomorfik.

Analisis lanjutan yaitu dengan penghitungan frekuensi alel pada semua lokus, jumlah rata-rata alel per lokus, derajat polimorfisme, dan heterozigositas rata-rata pada masing-masing populasi disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa populasi ikan mas majalaya mempunyai 3 lokus polimorfik, sedangkan ketiga populasi lainnya yaitu wildan, rajadanu, dan sutisna mempunyai lokus yang monomorfik. Jumlah rata-rata alel per lokus pada populasi majalaya sebesar 1,8; sedangkan pada ketiga populasi lainnya sebesar 1. Derajat polimorfisme menggunakan kriteria $P_{0,95}$ pada populasi majalaya sebesar 0,20; sedangkan nilai heterozigositas rata-rata sebesar 0,216. Derajat polimorfisme dan nilai heterozigositas pada ketiga populasi lainnya adalah 0. Hal ini diduga karena jumlah sampel kurang banyak.

Berdasarkan Tabel 2, selanjutnya dicari nilai jarak genetik antar populasi. Jarak genetik adalah parameter untuk menyatakan tingkat perbedaan struktur genetik antar 2 populasi. Hasil analisis menunjukkan bahwa jarak genetik antar ketiga populasi yaitu rajadanu, wildan, dan sutisna sebesar 0, sedangkan jarak genetik antara ketiga populasi tersebut terhadap populasi majalaya sebesar 0,0018. Nilai jarak genetik

pada 4 populasi ikan mas pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan nilai jarak genetik, populasi dengan struktur genetik yang lebih dekat dikelompokkan dalam bentuk dendrogram (Gambar 1). Dari dendrogram tersebut terlihat bahwa populasi majalaya mempunyai struktur genetik yang berbeda dengan ketiga populasi lainnya, yang mengelompok pada satu kelompok.

Bahasan

Secara umum variasi genetik ikan mas dalam penelitian ini yang diindikasikan dengan derajat polimorfisme, jumlah alel per lokus, dan heterozigositas, rata-rata relatif rendah. Rendahnya nilai variasi genetik ikan banyak ditemui pada ikan-ikan budi daya baik budi daya air tawar, air payau, maupun air laut seperti ikan nila (*O. niloticus*) (Eknath *et al.*, 1991), ikan gurami (*O. gouramy*) (Soewardi, 1992), udang windu (*Penaeus monodon*) (Imron *et al.*, 1999), dan ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) (Permana *et al.*, 2001). Penyebab rendahnya nilai variasi genetik pada populasi ikan budi daya tersebut diduga karena terjadinya reduksi pada variabilitas genetiknya. Beberapa faktor dapat menjadi penyebab terjadinya reduksi pada variabilitas genetik ikan budi daya antara lain karena aktivitas seleksi induk, terjadinya silang dalam (*inbreeding*), dan *random genetic drift* atau *bottleneck effect* (Imron *et al.*, 1999). Pada penelitian ini, kemungkinan terjadinya silang

Tabel 1. Jenis enzim yang dianalisis, lokus, alel yang diidentifikasi, jaringan, dan larutan penyangga yang digunakan pada penelitian ikan mas

Table 1. List of enzymes analysed, loci, alleles detected, tissue, and buffer used in the common carp (*C. carpio*) study

Enzim Enzym	Lokus Loci	Alel Alleles	Jaringan Tissue	Penyangga Buffer
Lactate dehydrogenase	Ldh-1	105	Otot	TC-6.3
		100	Muscle	
	Ldh-2	90		
Malate dehydrogenase	Mdh-1	105	Otot	TC-6.3
		100	Muscle	
	Mdh-2	80		
Isocitrate dehydrogenase	ldh-1	100	Otot	TC-6.3
	ldh-2	90	Muscle	
Maleic enzym	Me	105	Otot	TC-6.3
		100	Muscle	
		95		

TC-6.3 = Triss-citric acid buffer, pH 6.3

Tabel 2. Frekuensi alel pada masing-masing lokus, derajat polimorfisme, dan heterozigositas rata-rata pada populasi ikan mas

Table 2. Alleles frequencies at each biochemical marker loci, degree of polymorphism and average heterozigosities in common carp (*C. carpio*) populations

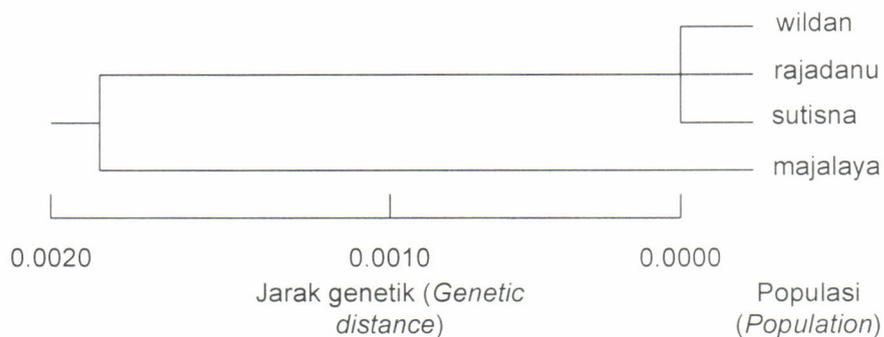
Lokus Loci	Alel Alleles	Populasi (Population)			
		majalaya (n=20)	wildan (n=20)	rajadanu (n=20)	sutisna (n=20)
Ldh-1	105	0.05	0	0	0
	100	0.95	1	1	1
Ldh-2	90	1	1	1	1
Mdh-1	105	0.15	0	0	0
	100	0.85	1	1	1
Mdh-2	80	1	1	1	1
Me	105	0.025	ND	ND	ND
	100	0.875			
	95	0.1			
ldh-1	100	ND	ND	1	ND
ldh-2	90	ND	ND	1	ND
		1.8	1	1	1
	0.2	0	0	0	
	0.216	0	0	0	

n = Jumlah individu (Total individu)
 ND= Tidak terdeteksi (Not detected)

Tabel 3. Jarak genetik antar populasi ikan mas

Table 3. Genetic distance between every pair of common carps populations

Populasi Population	Jarak genetik (Genetic distance)			
	majalaya	wildan	rajadanu	sutisna
majalaya	-	0.0018	0.0018	0.0018
wildan		-	0	0
rajadanu			-	0
sutisna				-



Gambar 1. Dendrogram yang menggambarkan hubungan antar populasi ikan mas
 Figure 1. Dendrogram showing relationship among populations of common carps

dalam pada populasi ikan mas yang dipakai relatif kecil. Hal ini karena induk-induk ikan mas yang dipijahkan dipelihara secara terpisah dan terkontrol untuk menjaga kemurniannya serta menghindari terjadinya silang dalam (*inbreeding*) dan perkawinan dengan jenis-jenis ikan mas yang lain. Berdasarkan analisis tersebut, kemungkinan penyebab rendahnya variasi genetik pada populasi ikan mas adalah karena pengaruh aktivitas seleksi dan *random genetic drift* atau *bottleneck effect*. Selama beberapa tahun, ikan-ikan mas tersebut dipelihara untuk tujuan pemuliaan, sehingga aktivitas seleksi merupakan kegiatan yang sering dilakukan terhadap populasi ikan mas tersebut. Selain itu, penggunaan jumlah induk yang sedikit dalam setiap pemijahannya diduga kuat menjadi penyebab rendahnya nilai variasi genetik pada populasi ikan mas ini. Seperti yang dikatakan Imron *et al.* (1999) dan Permana *et al.* (2001) bahwa penggunaan induk yang sedikit akan menyebabkan kemungkinan terjadinya *random genetic drift* atau *bottleneck effect* semakin besar. Hal ini karena jumlah induk yang digunakan tidak mewakili keseluruhan *gene pool* dari populasi alaminya. Untuk menghindari terjadinya kehilangan lokus-lokus polimorfik pada populasi ikan mas, disarankan supaya menambah jumlah induk dalam setiap pemijahannya. Jumlah populasi induk efektif yang digunakan untuk pengembangbiakan ikan-ikan mempunyai panjang umur sedang (1--2 tahun) adalah antara 50--500 pasang.

Perbedaan frekuensi alel yang terjadi terutama pada populasi majalaya dibanding ketiga populasi yang lain mengindikasikan bahwa *gene pool* populasi majalaya tidak sama dengan ketiga populasi lainnya yang diduga mempunyai *gene pool* yang sama. Namun demikian, walaupun populasi rajadanu, wildan, dan sutisna berasal dari *gene pool* yang sama, tetapi terdapat perbedaan lokus yang ditemukan. Lokus *ldh-1* dan *ldh-2* ditemukan pada populasi rajadanu tetapi tidak ditemukan pada kedua populasi yang lain. Hal ini diduga disebabkan karena pengaruh lingkungan. Hasil penelitian Powers & Place (1978) terhadap spesies *Fundulus heteroclitus* mengatakan bahwa perbedaan lingkungan yang mengakibatkan terjadinya gradien suhu berpengaruh terhadap alel dan lokus yang ditemukan. Fenomena ini diduga terjadi pada ketiga populasi ikan mas tersebut. Populasi ikan mas rajadanu berasal dari Cirebon yang merupakan daerah dataran rendah dan mempunyai suhu relatif tinggi sedangkan populasi wildan dan sutisna masing-masing berasal dari daerah Cianjur dan Kuningan. Kedua daerah tersebut termasuk dalam kategori dataran tinggi dan mempunyai suhu relatif rendah. Untuk mengklarifikasi hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian dan pengkajian yang lebih mendalam.

Nilai rata-rata jarak genetik pada keempat populasi ikan mas sebesar 0,00045. Rendahnya nilai tersebut diduga karena telah terjadi intrograsi genetik antar populasi. Hal ini terjadi karena keempat populasi ikan mas tersebut berasal dari daerah-daerah yang relatif dekat (Cirebon, Kuningan, Majalaya, dan Cianjur) sehingga kemungkinan terjadi pertukaran induk antar daerah sangat besar. Pertukaran induk tersebut diduga telah terjadi sejak sebelum kegiatan koleksi yang dilakukan oleh Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar bekerja sama dengan IDRC (*International Development Research Centre*) pada awal kegiatan pemuliaan ikan mas ini dilakukan, yaitu antara tahun 1986--1995.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil analisis beberapa parameter genetik disimpulkan bahwa variasi genetik populasi ikan mas relatif rendah. Populasi ikan mas majalaya mempunyai variasi genetik lebih tinggi daripada populasi wildan, rajadanu, dan sutisna. Nilai heterozigositas rata-rata populasi ikan mas majalaya sebesar 0,216; sedangkan ketiga populasi lainnya 0. Jarak genetik antara populasi majalaya dengan ketiga populasi lainnya sebesar 0,0018.

Di dalam metode pemuliaan ikan mas pada tahap selanjutnya disarankan untuk melakukan hibridisasi antar populasi dalam rangka meningkatkan variasi genetiknya. Selain itu, penambahan jumlah induk pada kegiatan pemijahan juga disarankan untuk mengurangi kemungkinan terjadinya penurunan variasi genetik pada ikan mas.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1999. *Statistik Perikanan Indonesia 1997*. Direktorat Jenderal Perikanan. Jakarta. 48 pp.
- Eknath, A.E., J.M. Macaranas, L.Q. Agustin, R.R. Velasco, M.C.A. Ablan, M.J.R. Pante, and R.S.V. Pullin. 1991. *Biochemical and Morphometric Approaches to Characterize Farmed Tilapias*. ICLARM Quarterly Report, Manila. 14(2): 7--9.
- FAO. 1997. *Aquaculture Production (1986--1995)*. FAO Fisheries circular 815: 195.
- Gustiano, R. 1994. Prospect of common carp culture in rural areas. *IARD Journal* 16 (2):24--28.
- Gustiano, R., A. Hardjamulia and A. Rukyani. 1998. Current status of common carp genetic research and breeding practices in Indonesia. *Paper Submitted in Intl. Workshop on "Genetic Improvement of Carp in Asia"*, 26-29 July 1997. Bhubaneswar India, 15 pp.
- Hadadi, A. 1999. Rekayasa teknik pemurnian induk dan peningkatan mutu benih ikan mas di Balai Budidaya Air Tawar, Sukabumi. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Genetika Ikan*. Jakarta, 8 Februari 1999. p. 19--22.

- Hardjamulia, A., S. Asih, H. Supriyadi, dan B. Mucharam. 1996. Karakterisasi morfologis dan evaluasi beberapa plasma nutfah ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Bulletin Plasma Nutfah*. 11(1): 24--28.
- Hardjosubroto, W. 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. PT Grasindo Indonesia, Jakarta. 284 pp.
- Imron, K. Sugama, K. Sumantadinata, dan K. Soewardi. 1999. Genetic variation in cultured stock of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Indonesia. *Indonesian Fish. Res. J.* V(1): 10--18.
- Imron, Subagyo, dan O.Z. Arifin. 2000. Keragaman truss morfometrik 4 strain ikan mas: majalaya, rajadanu, wildan, dan sutisna. *Prosiding Hasil Penelitian Perikanan 1999*. Puslitbang Perikanan. p. 188--197.
- Leary, L.F. and H.E. Booke. 1990. Starch gel electrophoresis and species distinction. In: Shreck, C.B. and P.B. Moyle (Eds.). *Methods for Fish Biology*. Am. Fish. Soc., Bethesda, Maryland, USA. p. 141--170.
- Maskur, R.W., Doyle, N. Wahyudi., T. Susilowati, and L. Dharma. 1996. A case study on common carp broodstock management in West Java. *Indonesian Technical Report of CRIFI Jakarta*. 19 pp.
- Matricia, T. 1990. *Morphological and Growth Variability Among Common Carp Population in Different Geographical Areas in Indonesia*. MSc. Thesis. Dalhousie Univ., Halifax, NS, Canada. 153 pp.
- Nugroho, E. and N.A. Wahyudi. 1991. Selection of several strains of common carp from various location in Indonesia by Z. score. *Fish. Res. Bull.* 10 (2): 9--55.
- Permana, I G.N., S.B. Moria, Haryanti, dan K. Sugama. 2001. Pengaruh domestikasi terhadap variasi genetik pada ikan kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) yang dideteksi dengan allozyme electrophoresis. *J. Pen. Per. Indonesia*. 7(1): 25--30.
- Powers, D.A. and A.R. Place. 1978. Biochemical genetic of *Fundulus heteroclitus* (L). I. Temporal and spatial variation in gene frequencies of Ldh-B, Mdh-A, Gpi-B and Pgm-A. *Biochem. Genet.* 16: 593--607.
- Shaklee, J.B., F.M. Allendorf, D.C. Marizot, and G.S. Whitt. 1990. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 2--15.
- Sokal, R.R. and G. Rohlf. 1981. *Biometry*. Freeman and Co. San Fransisco, Calif. 776 pp.
- Soewardi, K. 1995. Karakterisasi populasi ikan gurame (*Osphronemus gouramy*, Lacepede), dengan metode biokimia. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*, III(2): 33--39.
- Sumantadinata, K. and N. Taniguchi. 1991. Comparison of electrophoretic allele frequencies and genetic variability of the common carp stocks from Indonesia and Japan. In: *Improvement of Inland Aquaculture*. NODAI centre for international programs. Tokyo University of Agriculture.
- Takezaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenic trees from microsatellite DNA. *Genet.* 144: 389--399.
- Taniguchi, N. and K. Sugama. 1990. Genetic population and structure of red sea bream in the coastal waters of Japan in the East China Sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 56: 1,069--1,077.
- Tanighuci, N., Y. Honma, and K. Kawamata. 1990. Genetic differentiation of freshwater and anadromous threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) from northern Japan. *Japanese J. of Ich.* 37(3): 230--237.
- Tave, D. 1996. Selective breeding programmes for medium-sized fish farms. *FAO Fish. Tech. Paper*. 352: 122.