

KARAKTERISTIK GENETIK DAN STRUKTUR POPULASI IKAN NAPOLEON, *Cheilinus undulatus* DI PERAIRAN INDONESIA

Sari Budi Moria¹⁾, Haryanti²⁾, Gusti Ngurah Permana³⁾, dan Bejo Slamet⁴⁾

ABSTRAK

Evaluasi karakteristik genetik ikan napoleon, *Cheilinus undulatus* sudah dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik dan struktur populasi di alam dalam upaya mendukung pembenihan terkontrol. Sampel ikan napoleon diambil dari 7 (tujuh) lokasi perairan di Indonesia yaitu: P. Seram (Ambon), Karimun Jawa (Jawa Tengah), P. Sedanau (Kepulauan Riau), P. Selayar (Sulawesi Selatan), Labuan Bajo (Nusa Tenggara Timur), Tanjung Ekas (Nusa Tenggara Barat), dan P. Kangean (Madura/Jawa Timur), masing-masing sebanyak 20 ekor. Analisis karakter genetik dilakukan dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) mt-DNA, menggunakan 4 (empat) enzim restriksi (*Hae* III, *Hinf* I, *Hha* I, dan *Mbo* I). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa keragaman genetik tertinggi terdapat pada populasi dari perairan Labuan Bajo (NTT) (0,469) sedangkan yang terendah pada populasi perairan Karimun Jawa (Jateng) (0,201). Jarak genetik rata-rata antara populasi ikan napoleon adalah 0,196. Struktur populasi ikan napoleon dapat dikelompokkan dalam empat kelompok yaitu (1) Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur; (2) Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat; (3) Jawa Tengah dan Kep. Riau, dan (4) Ambon.

ABSTRACT: *Genetic characterization and structure population of napoleon wrasse, Cheilinus undulatus in Indonesian waters. By: Sari Budi Moria, Haryanti, Gusti Ngurah Permana, and Bejo Slamet*

Evaluation of genetic characterization of wild napoleon wrasse, Cheilinus undulatus was conducted to know genetic variation and population structure as basic knowledge in order to develop sustainable breeding. Samples of napoleon wrasse collected from seven locations in Indonesian waters i.e.; Seram Island (Ambon), Karimun Jawa (Central Java), Sedanau Island (Riau Archipelago), Selayar Island (South Sulawesi), Labuan Bajo (East Nusa Tenggara), Ekas Bay (West Nusa Tenggara), and Kangean Island (Madura/East Java), Number of samples from each location were 20 fishes. RFLP mt-DNA analysis was applied using four restriction enzymes (Hae III, Hinf I, Hha I and MboI) to digest. The results showed that the highest genetic variation was shown on napoleon wrasse population from Labuan Bajo (East Nusa Tenggara) waters at 0.469 and the lowest from Karimun Jawa (Central Java) waters at 0.201. Mean genetic distance of napoleon wrasse among population was 0.196. Napoleon wrasse population can be divided into four groups are (1) South Sulawesi and East Nusa Tenggara; (2) East Java and West Nusa Tenggara; (3) Central Java and Riau Archipelago, and (4) Ambon.

KEYWORDS: *genetic characterization, RFLP-mt-DNA, population structure, wild napoleon wrasse*

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

PENDAHULUAN

Komoditas ekspor ikan napoleon masih merupakan hasil tangkapan dari alam dan sudah sangat sulit diperoleh pada beberapa perairan di Indonesia. Akibat penangkapan yang berlebihan, maka pemerintah telah mengeluarkan kebijakan tentang larangan penangkapan dan ekspor ikan Napoleon. Selain itu dianjurkan bahwa instansi pemerintah untuk melaksanakan penangkaran (budi daya) ikan napoleon (Sudarsono *et al.*, 1999). Kegiatan budi daya ikan napoleon telah dirintis di Kepulauan Riau, Kepulauan Seribu, Kepulauan Karimun Jawa, Kangean, Bawean, Nusa Tenggara, dan Sulawesi Selatan. Namun kegiatannya masih dalam skala kecil dan merupakan usaha penampungan atau pembesaran hasil tangkapan alam melalui pemeliharaan hingga mencapai ukuran konsumsi.

Kendala utama pada usaha budi daya ikan napoleon adalah kurang tersedianya benih, karena benih yang berasal dari alam semakin sulit didapatkan. Upaya pembenihan perlu segera dirintis di samping sebagai pemenuhan kebutuhan benih untuk budi daya juga untuk *restocking* dalam rangka pemulihan populasi di alam yang sudah langka. Upaya perbenihan ikan napoleon telah dirintis oleh Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol-Bali, dari teknik pematangan gonad hingga pemijahan telah berhasil dilakukan dengan cara manipulasi pakan dan hormonal (Slamet *et al.*, 1998; 1999; 2001a; 2001b; 2005). Namun untuk menghasilkan benih ikan napoleon, masih belum dapat direalisasikan oleh karena sintasan larva napoleon yang sangat rendah dan hanya dapat bertahan hidup hingga hari ke-7 sampai 10 setelah penetasan telur (Hutapea & Slamet, 2005).

Dengan rendahnya sintasan larva ikan napoleon, maka perlu dievaluasi langkah selanjutnya yang terkait dengan aspek biologi induk dan larva. Salah satu aspek yang perlu dicermati adalah mengevaluasi sumber genetik ikan di alam untuk penyediaan mutu genetik ikan untuk pembenihan dan menghindari hilangnya sebagian karakter genetik benih turunannya (Goundie *et al.*, 1995; Benzie & William, 1996; Sugama *et al.*, 1998). Penurunan karakter genetik ditentukan oleh lokus polimorfik, heterosigositas, dan jumlah alel per lokus (Taniguchi *et al.*, 1983; Sugama *et al.*, 1988).

Penurunan karakter genetik akibat hilangnya alel-alel langka dari hasil pembenihan dapat

menghambat pertumbuhan, rentan terhadap serangan penyakit serta perubahan lingkungan (Leary *et al.*, 1985). Oleh karena itu upaya penelusuran dan inventarisasi karakteristik genetik ikan napoleon pada tingkat mt-DNA perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi hubungan dan struktur populasinya di alam. Upaya penelusuran karakteristik genetik dengan metode allozyme sudah dilakukan dan menunjukkan hasil adanya hubungan genetik serta memiliki tiga lokus polimorfik yaitu EST, PGM, dan MPI (Wibowo, 2001). Berdasarkan hal tersebut di atas, maka penelitian ini dilakukan pada tingkat molekuler untuk mengevaluasi karakteristik genetik dan struktur populasi ikan napoleon di alam dari berbagai lokasi perairan di Indonesia dengan menggunakan metode RFLP mt-DNA. Evaluasi ini diharapkan dapat memperoleh informasi yang berhubungan dengan sumber genetik unggul pada calon induk ikan napoleon untuk kepentingan pengelolaan pembenihan di hatcheri.

BAHAN DAN METODE

Sampel Ikan Napoleon, C. undulatus

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan berasal dari hasil tangkapan di alam terdiri atas 7 (tujuh) populasi daerah penangkapan yang berbeda (Gambar 1) yaitu: di perairan Pulau Selayar (Sulawesi Selatan), Teluk Ekas (Nusa Tenggara Barat), Labuan Bajo (Nusa Tenggara Timur), Pulau Kangean (Madura/Jawa Timur), Pulau Seram (Ambon), Karimun Jawa (Jawa Tengah), dan Pulau Sedanao (Kepulauan Riau), masing-masing sebanyak 20 ekor. Ukuran panjang dan bobot masing-masing sampel disajikan pada Tabel 1.

Ekstraksi DNA

DNA ikan diekstraksi dari daging atau sirip ekor dengan mengikuti metode Ovenden (2000) yaitu 5-10 mg daging dimasukkan dalam tabung 1,5 ml yang telah berisi 200 µl larutan 10% Chelex-100 dalam TE pH-8, kemudian ditambahkan 5 ml proteinase kinase (20 mg/ml) dan diinkubasikan dalam *thermoblock* pada suhu 55°C selama 2,5 jam. Selanjutnya suhu dinaikkan menjadi 89°C dan diinkubasi kembali selama 8 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, kemudian disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Lapisan supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru dan disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel ikan napoleon (*C. undulatus*)
 Figure 1. Locations of collecting samples of wild napoleon wrasse (*C. undulatus*)

Tabel 1. Panjang total (mm) dan bobot (g) rata-rata ikan napoleon, *C. undulatus*
 Table 1. Mean total length (mm) and body weight (g) of napoleon wrasse *C. undulatus*

Lokasi Location	Panjang total rata-rata Mean total length (cm)	Bobot rata-rata Mean body weight (g)
P. Selayar (Sulawesi Selatan/ South Sulawesi)	28.5 ± 2.55	255.15 ± 70.5
T. Ekas (Nusa Tenggara Barat/ West Nusa Tenggara)	24.13 ± 2.04	245.12 ± 68.5
L. Bajo (Nusa Tenggara Timur/ East Nusa Tenggara)	26.6 ± 2.45	265.30 ± 72.5
P. Kangean (Madura/Jatim/ East Jawa)	25.3 ± 2.24	260.25 ± 75.3
P. Seram (Ambon)	24.70 ± 5.45	309.65 ± 200.91
Karimun Jawa (Jateng/ Central Jawa)	25.62 ± 3.23	293.98 ± 134.74
P. Sedanau (Kepulauan Riau/ Riau Archipelago)	28.41 ± 1.62	469.25 ± 80.20

RFLP-mt DNA

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sekuens mitokondria adalah primer 16 Sr DNA-1 (5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3') dan 16 Sr DNA-2 (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'). Amplifikasi dilakukan menggunakan metode Polymerize Chain Reaction (PCR) dengan komposisi reaksi yang terdiri atas : dd H₂O, 10 pmol setiap primer dan "Ready To Go (Amersham) dan genome mt DNA sampel dengan total volume akhir 25 µl. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah satu siklus denaturasi pada suhu 93°C selama 2 menit. 33 siklus pengandaan yang terdiri atas 93°C selama 30 detik, 50°C selama 30 detik, dan 72°C selama 45 detik. Template mt-DNA produk amplifikasi PCR dipotong dengan 4 (empat) enzim restriksi *Mbo I* ('GATC), *Hha I* (GCG'C), *Hae III* (GG'CC) dan *Hinf I* (G'ANTC) (Moria et al., 2005). Hasil restriksi kemudian dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1,5% dalam 1x Tris-Boric-Acid (TBE) buffer dan diamati dengan illuminator (UV) serta didokumentasikan dengan gel camera polaroid. Untuk mengetahui berat molekul DNA dengan menggunakan alat "Biodoc Analyze".

Analisis Data

Untuk mengevaluasi variasi DNA antar populasi ikan napoleon dilakukan analisa Chi-square dari hukum Hardy-Weinberg dengan menggunakan software GEN-POP Program. Kekerbatan antar populasi dianalisis dengan menggunakan jarak genetik (Roger's, 1972 dalam Raymond, 1995).

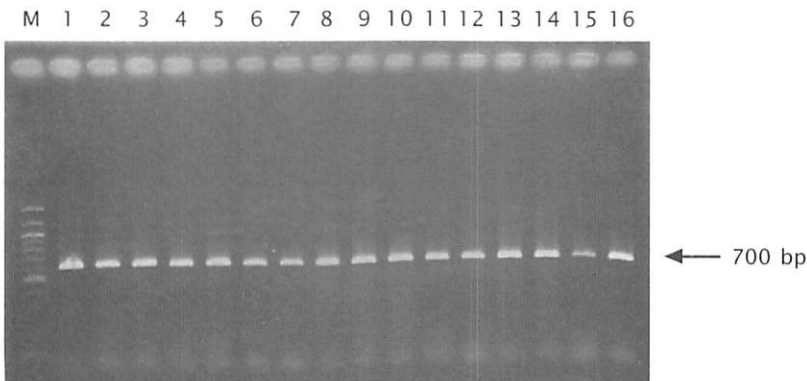
HASIL DAN BAHASAN

Sekuens mt-DNA ikan napoleon hasil PCR mempunyai panjang sekitar 700 bp (Gambar 2). Dari empat enzim restriksi yang digunakan untuk memotong PCR produk tersebut (*Hae III*, *Hha I*, *Hinf I* dan *Mbo I*) semuanya mempunyai situs pemotongan. Pemotongan sekuens mt-DNA dengan menggunakan enzim *Mbo I* dan *Hha I* menghasilkan 2 dan 3 jenis pola restriksi, sedangkan enzim *Hae III*, dan *Hinf I* hanya mempunyai 2 pola restriksi (Gambar 3). Ukuran fragmen bervariasi yaitu 95 dan 605 bp untuk enzim *Hae III*; 150 dan 550 bp pada enzim *Hinf I*; 125;200 dan 375 bp untuk enzim *Hha I* serta 75;200 dan 425 bp untuk enzim *Mbo I*.

Keragaman fragment mt-DNA ikan napoleon untuk ke empat jenis enzim restriksi pada masing-masing lokasi disajikan pada Tabel 2.

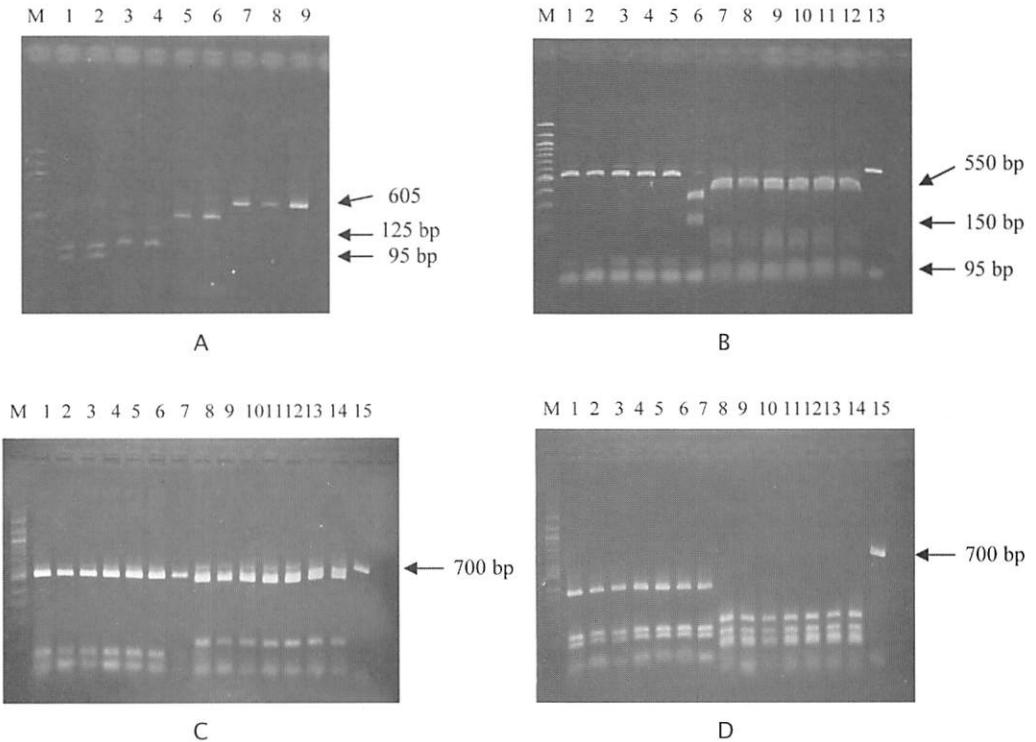
Dari Tabel 2 terlihat empat populasi yaitu P. Kangean, P. Seram, Karimunjawa, dan P. Sedanau memiliki 2 fragmen yaitu A dan B. Sedangkan 3 populasi lainnya yaitu P. Selayar, T. Ekas, dan Labuan Bajo, memiliki 3 genotipe yaitu A, B, dan C. Alel frekuensi dan nilai heterosigositas dapat terlihat pada Tabel 3.

Dari hasil analisis dengan Gen-Pop terlihat bahwa genetic diversity dari keempat lokus yaitu *Hae III*, *Hha I*, *Hinf I*, dan *Mbo I* ternyata locus *Hha I* memberikan variasi yang lebih besar. Dengan demikian, enzim restriksi *Hha I* dapat digunakan untuk penentuan marka genetik dengan metode RFLP pada ikan napoleon.



Gambar 2. Amplifikasi PCR dari genom mt-DNA ikan napoleon, *C. undulatus* (M= marker 100 bp ladder; 1-6 sampel ikan napoleon)

Figure 2. PCR amplification of mt-DNA genome of napoleon wrasse, *C. undulatus* (M= marker ladder 100 bp, 1-6; napoleon wrasse samples)



Gambar 3. Pola pemotongan hasil amplifikasi PCR ikan napoleon (*C. undulatus*) dengan empat enzim restriksi (A: enzim *Hae III* (1-2); *Hha I* (3-4); *Hinf I* (5-6) dan *Mbo I* (7-8); B: enzim *Hae III* (1-7) dan *Hha I* (8-12); C: enzim *Hae III* (1-7) dan *Hinf I* (8-14); D: enzim *Hha I* (1-7) dan *Mbo I* (8-14))

Figure 3. Patterns of PCR product of napoleon wrasse (*C. undulatus*) digested by using four restriction enzymes (A: enzyme *Hae III* (1-2); *Hha I* (3-4); *Hinf I* (5-6) and *Mbo I* (7-8); B: enzyme *Hae III* (1-7) and *Hha I* (8-12); C: enzyme *Hae III* (1-7) and *Hinf I* (8-14); D: enzyme *Hha I* (1-7) and *Mbo I* (8-14))

Persentase lokus polimorfik tertinggi terdapat pada populasi ikan napoleon dari perairan P. Selayar dan Labuan Bajo (1.0), sedangkan yang terendah terdapat pada populasi dari P. Seram dan P. Sedanau (0.5). Untuk ketiga populasi yang lainnya menunjukkan keragaman genetik yang sama yaitu 0.75 (Tabel 3). Sedangkan nilai heterosigositas tertinggi terlihat pada populasi ikan napoleon dari Labuan Bajo (Nusa Tenggara Timur) yaitu sebesar 0,469 dan nilai yang terendah dimiliki oleh populasi ikan napoleon dari Karimun Jawa (Jawa Tengah) sebesar 0,201. Tingkat atau level variasi genetik ikan napoleon yang diamati relatif lebih tinggi dibandingkan ikan laut lainnya, seperti pada ikan kakap merah, *Lutjanus malabaricus* (0,001-0,028) (Permana *et al.*, 2003), ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus* (Andamari *et al.*, 2004).

Relatif tingginya variasi genetik pada ikan napoleon ini karena budi daya komoditas ini masih belum banyak dilakukan dan diduga ikan napoleon mempunyai tingkat perpindahan (migrasi) yang lebih tinggi dibandingkan ikan karang lainnya, sehingga peluang untuk adanya pengaliran gen dengan populasi lain semakin besar pula. Selanjutnya Imron *et al.* (1999), menjelaskan bahwa populasi dengan variasi genetik yang tinggi akan memiliki peluang hidup yang semakin tinggi untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Heterosigositas yang tinggi memungkinkan perbaikan mutu genetik populasi dengan mengeksplorasi gen-gen yang menguntungkan.

Selanjutnya menurut Allendorf & Phelps (1980), populasi dengan nilai rata-rata heterosigot yang tinggi akan memperlihatkan tingginya variabilitas genetik untuk suatu fenotif

Tabel 2. Keragaman fragmen mt DNA pada masing-masing enzim restriksi dengan berat molekul 700 bp pada ikan napoleon, *C. undulatus* dari 7 populasi yang berbeda
 Table 2. DNA fragment variation on each restriction enzyme at molecule weight of 700 bp among seven population on napoleon wrasse, *C. undulatus*

Lokasi <i>Location</i>	Enzim restriksi <i>Restriction enzyme</i>	Keragaman fragment DNA <i>DNA fragment variation</i>		
		1	2	3
P. Selayar (Sulsel)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	C
	Hinf I	A	B	-
	Mbo I	-	-	C
T. Ekas (NTB)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	-
	Hinf I	A	B	-
	Mbo I	-	B	C
Labuan Bajo (NTT)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	C
	Hinf I	A	B	-
	Mbo I		B	C
P. Kangean (Madura/Jatim)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	-
	Hinf I	A	-	-
	Mbo I	A	-	-
P. Seram (Ambon)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	-
	Hinf I	-	B	-
	Mbo I	A	B	-
Karimun Jawa (Jateng)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	-
	Hinf I	-	B	-
	Mbo I	A	-	-
P. Sedanau (Kepulauan Riau)	Hae III	A	B	-
	Hha I	A	B	-
	Hinf I	A	B	-
	Mbo I	A	-	-

seperti rata-rata pertumbuhan, sintasan dan normalitas benih turunannya. Adanya perbedaan nilai heterosigositas menggambarkan adanya perbedaan lingkungan di antara populasi. Pada lingkungan yang stabil akan lebih sedikit ditemukan variasi alel daripada kondisi lingkungan yang labil, karena laju mutasi atau seleksi lingkungan relatif rendah.

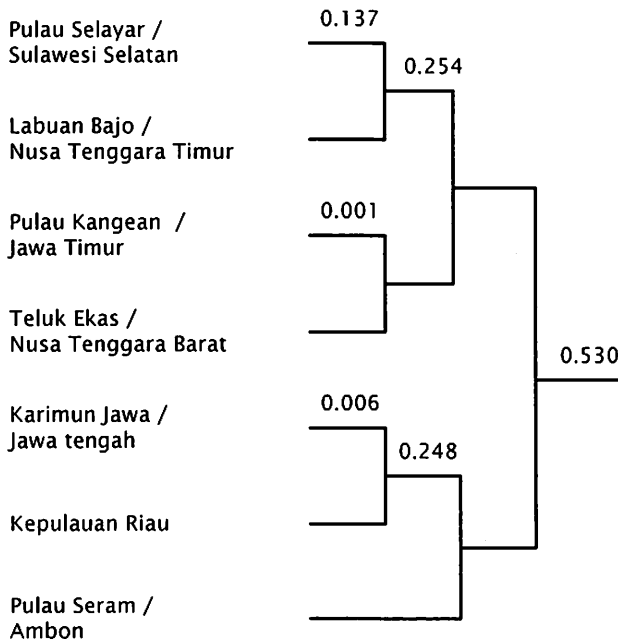
Jarak genetik ikan napoleon yang dihitung menurut Rogers (1972), berdasarkan situs

restriksi dari 4 enzim antar lokasi perairan tertera pada Gambar 3. Jarak genetik rata-rata antara populasi ikan napoleon adalah 0,196. Dendogram yang dibentuk berdasarkan jarak genetik tersebut menunjukkan bahwa populasi Jatim dan NTB mempunyai jarak genetik terdekat (0,001), begitu juga populasi Jawa Tengah dengan Kep. Riau (0,006). Sedangkan kelompok populasi dari Sulawesi Selatan, Nusa Tenggara Timur, Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat mempunyai jarak genetik yang jauh

Tabel 3. Allel frekuensi, variasi genetik dan heterosigositas pada 7 populasi ikan napoleon dari alam, *C. undulatus*

Table 3. Allele frequency, genetic variation and heterozygosity of wild napoleon wrasse, *C. undulatus* among seven populations

Parameter Item	P. Selayar (Sulsel)	T. Ekas (NTB)	L. Bajo (NTT)	P. Kangean Jawa Timur	P. Seram (Ambon)	P. Sedanau (Kep. Riau)	K. Jawa (Jateng)
Jumlah sample <i>No. of sample examined</i>	20	20	20	20	20	20	25
Jumlah lokus <i>No. of loci examined</i>	4	4	4	4	4	4	4
Jumlah lokus polimorfik <i>No. of polymorphic loci</i>	4	3	4	3	3	4	2
Persentase lokus polimorfik <i>% polymorphic loci</i>	1	0.75	1	0.75	0.5	0.5	0.75
Jumlah alel per lokus <i>No. of allele per locus</i>	2	1.75	2.25	1.75	1	1.25	1
Heterosigositas <i>Heterozygosity</i>	0.308	0.375	0.469	0.375	0.214	0.296	0.201



Gambar 4. Kluster dendrogram ikan napoleon, *C. undulatus* berdasarkan hubungan genetik dari tujuh populasi

Figure 4. Cluster dendrogram summarizing the genetic relationship among seven population of napoleon wrasse, *C. undulatus* based on their genetic distance

(0,530) bila dibandingkan dengan kelompok populasi dari perairan Jawa Tengah, Kep. Riau dan Ambon. Nilai jarak genetik pada ikan napo-

leon ini relatif lebih besar. Hasil yang diperoleh sesuai dengan pendapat Ohtani *et.al.* (1997) yang menyatakan bahwa jenis-jenis ikan yang

berhabitat di area terumbu karang atau litoral cenderung memiliki nilai jarak genetik (Da) yang tinggi pada sub populasinya. Napoleon adalah termasuk satu di antara ikan yang hidup di sekitar terumbu karang, sehingga ikan ini mempunyai karakteristik biologi dan ekologi yang spesifik seperti bertelur di dasar perairan dan di antara terumbu karang.

Berdasarkan hasil perhitungan jarak genetik, maka terlihat bahwa dari 7 populasi ikan napoleon yang dikoleksi dapat di gambarkan bahwa struktur populasi terbagi menjadi 4 kelompok yaitu (1) Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur; (2) Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat; (3) Jawa Tengah dan Kep. Riau dan (4) Ambon. Adanya perbedaan genetik dari 4 kelompok tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya *breeding stock* yang terpisah dan larva ikan secara aktif tetap berada pada habitat di sekitar tempat pemijahannya atau adanya aliran arus dengan variabilitas yang tinggi secara positif larva ikan terbawa menuju habitat perairan lain. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa stok populasi ikan napoleon tidak terpisah secara tegas, namun ada beberapa populasi terdapat pada struktur populasi yang sama.

KESIMPULAN

- ❖ Enzim restriksi *Hha I* dapat memberikan ekspresi polimorfik sehingga dapat digunakan sebagai marker genetik ikan napoleon pada tingkat molekuler dengan metode RFLP mt-DNA.
- ❖ Keragaman genetik dengan nilai heterosigositas tertinggi terdapat pada populasi ikan napoleon dari perairan Labuan Bajo (Nusa Tenggara Timur).
- ❖ Secara geografis populasi ikan napoleon dapat dikelompokkan dalam empat kelompok yaitu (1) Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Timur; (2) Jawa Timur dan Nusa Tenggara Barat; (3) Jawa Tengah dan Kep. Riau serta (4) Ambon.

DAFTAR PUSTAKA

- Allendorf, F.W. and S.R. Phelps. 1980. Loss of genetic variation in hatchery stock of cut throat trout. *Trans Am.Fish.Soc.*, 109: 537--543.
- Andamari, R., Haryanti, K. Suwirya, S.B. Moria, dan G.N. Permana. 2004. Bioreproduksi dan Karakteristik variasi genetik ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus*. Laporan Teknis Proyek Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali, 12 pp.
- Benzie, J.A.H. and S.T.W. Williams. 1996. Limitation of the genetic variation of hatchery produced batches of napoleon clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture*, 139: 225--241.
- Goundie, C.A., Q. Liu, B.A. Simeo, and K.B. Davis. 1995. Genetic relationship of growth sex and glucose phosphate isomerase-B in channel cat fish. *Aquaculture*, 138: 119--124.
- Hutapea, J.H. and B. Slamet. 2005. Development of Napoleon Wrasse, *Cheilinus undulatus* larvae. *World Aquaculture 2005*, Nusadua-Bali, Indonesia. May 9-13.2005, 10 pp.
- Imron, K. Sugama, K. Sumantadinata, and K. Soewardi. 1999. Genetic variation in cultured stocks of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Indonesia. *Indonesian Fisheries Research Journal*: 5(1): 10--18.
- Leary, F.L., F.W. Allendorf, and K.L. Knudsen. 1985. Developmental Instability as an Indicator of Reduced genetic variation in Hatchery Trout. *Trans.Am.Fish.Soc.*, 114: 230--235.
- Moria, S.B., Haryanti, G.N. Permana, I.B. Wardana, dan B. Slamet. 2005. Studi Pendahuluan karakter genetik ikan napoeon, *Cheilinus undulatus* dengan metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) mt-DNA. Laporan Teknis BBRPBL Gondol-Bali. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Perikanan Dan Kelautan Tahun 2005*, p. 48--54.
- Ohtani, T., K. Miyahara, and N. Shimamoto. 1997. Genetic variability of allozymes in japanese Sea Bass, *Lateolabrax japonicus* in the coastal water of Hyogo prefecture. *Fisheries Science*, 63(2): 175--178.
- Ovenden J. 2000. Development of Restriction Enzyme Markers for Red Snapper (*Lutjanus erythropterus* and *Lutjanus malabaricus*) Stock Discrimination Using Genetic Variation in Mitochondria DNA. *Molecular Fisheries Laboratory*, Southern Fisheries Centre, 18 pp.
- Permana, G.N., S.B. Moria, Haryanti, and K. Sugama. 2003. Genetic identification and variation of Red Snapper, *Lutjanus sp.* Through allozyme electrophoretic analysis. *Indonesian Fisheries Research Journal*, 9(1): 33--40.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetic Software for Exact Test and Ecumenicism. *J. Hered.*, 86: 248--249.

- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance, p.145-153. *In Studies in genetics*. VII.Ed.M.R.Wheeler Univ.Texas Publ.7213.354 pp.
- Slamet, B., Hersapto, dan Tridjoko. 1998. Pengamatan panjang-bobot, kebiasaan makan dan aspek biologi reproduksi ikan napoleon, *Cheilinus undulatus*. *Prosiding Seminar Teknologi Perikanan Pantai*. Bali 6-7 Agustus 1998. p. 119--123.
- Slamet, B., Hersapto, dan Tridjoko. 1999. Pematangan induk ikan napoleon, *Cheilinus undulatus* dengan perbandingan pakan segar yang berbeda. *Seminar Nasional Penelitian dan Desiminasi Teknologi Budidaya Laut dan Pantai*. Jakarta, 2 Desember 1999, p. 253--256.
- Slamet, B. dan T. Sutarmat. 2001a. Pematangan gonad dan pemijahan induk ikan napoleon dengan rangsangan suntikan hormon gonadotropin. *Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI*, Yogyakarta, 23-24 Oktober 2001, p. 573-578.
- Slamet, B. dan T. Sutarmat. 2001b. Pematangan gonad dan pemijahan induk ikan napoleon dengan rangsangan suntikan hormon LHRH- α . *Prosiding Simposium Pemuliaan VI*, Malang, 28 Agustus 2001, p. 156--159.
- Slamet, B., J.H. Hutapea, dan G. Arief. 2005. Pematangan gonad dan pemijahan induk ikan napoleon, (*Cheilinus undulatus*) dengan kombinasi berbagai pakan segar. *Buku Perikanan Berkelanjutan*, p. 95--102.
- Sudarsono, A., Yuspanani, dan Karsimin. 1999. Rekayasa Teknologi Domestikasi dan Pematangan Induk Napoleon (*Cheilinus undulatus*). *Laporan Tahunan Tahun Anggaran 1997/1998 BBL*, Lampung, p. 74--84.
- Sugama, K. 1988. Population genetic analysis of Black Sea Bream using biochemical markers. Thesis, Departement of Cultural Fisheries, Faculty of Agriculture Kochi university, 171 pp.
- Sugama, K., Tridjoko, Haryanti, S.B. Moria, dan F. Cholik. 1998. Genetic variation and population structure in the Humber grouper, *Cromileptes altivelis* throughout its range in Indonesia waters. *Indonesian Fisheries Research Journal*, 5(1): 32--38.
- Taniguchi, N., K. Sumantadinata, and S. Iyama. 1983. Genetic change in the first and second generation of hatchery stock of black sea bream. *Aquaculture*, 35: 309--320.
- Wibowo, A.H. 2001. Analisis Variasi Gen dan Struktur Populasi Genetik Ikan Napoleon (*Cheilinus undulatus*). *Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya, Malang*, 53 pp.