

Variasi Sekuens Gen Mitokondrial Sitokrom C Oksidase I dari Siput Lola (*Trochus niloticus*)

Agus Nuryanto¹⁾ dan Dedy Duryadi Solihin

¹⁾Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto
²⁾Jurusan Biologi FMIPA IPB

Diterima April 2005 disetujui untuk diterbitkan Januari 2006

Abstract

A study on sequence variation in the mitochondrial DNA of Trochus niloticus has been conducted. Polymerase chain reactions (PCR) technique was applied to amplify cytochrome c oxidase I gene of 533 bp and ABI 310 automatic DNA sequencer was used to sequence the PCR product. This study was aimed to know the genetic variation of T. niloticus and the suitability of partial sequence of cytochrome c oxidase I gene as a molecular marker in the genetic study. The results showed that from two T. niloticus specimens, 12 polymorphic sites were detected yielding 2 haplotypes. This indicated a highly genetic variation in the cytochrome c oxidase I (COI) gene of T. niloticus. In addition, cytochrome c oxidase I gene was proved to be a suitable marker for the genetics studies of various species of organisms.

Key words: *sequence variation, Trochus niloticus, cytochrome c oxidase I gene*

Pendahuluan

Siput lola (*Trochus niloticus*; Gastropoda) merupakan salah satu sumberdaya hayati laut yang memiliki nilai ekonomi penting bagi masyarakat Indonesia. Hal ini karena spesies lola tersebut memiliki kualitas cangkang yang paling baik jika dibandingkan dengan beberapa jenis *Trochus* dari negara-negara di Pasifik Selatan. Bahkan, keadaan ini telah digunakan oleh masyarakat Jepang sebagai standar untuk menentukan harga cangkang *Trochus*. Selain sebagai komoditas ekspor, di Indonesia sendiri cangkang *T. niloticus* telah digunakan sebagai bahan baku berbagai jenis perhiasan seperti anting-anting, kalung, cincin dan sebagainya. Lebih dari itu, daging *T. niloticus* juga telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia Timur sebagai sumber protein hewani.

Banyaknya produk yang membutuhkan bahan dasar dari *T. niloticus* telah mempertinggi nilai ekonominya. Menurut salah seorang penyelam di Bunaken, harga 1 kg *T. niloticus* (2 ekor) sebesar Rp. 50.000,- (Konsultasi Pribadi). Tingginya nilai ekonomi lola telah mendorong terjadinya peningkatan penggunaan *T. niloticus* baik sebagai komoditas industri maupun komoditas makanan. Kondisi tersebut telah berakibat pada peningkatan laju penangkapan *T. niloticus* yang berlebihan di perairan di luar daerah pantai. Bahkan, selama dua dekade lampau penangkapannya sangat intensif dan telah membahayakan populasi alaminya termasuk di wilayah Sulawesi Selatan dan Tenggara. *Overfishing* juga telah terlihat di beberapa wilayah lain dan kelangkaan telah terlihat nyata. Di Taman Nasional Laut Sulawesi Tenggara, kepadatan *T. niloticus* hanya kurang lebih 0,42/ha, sedangkan total populasinya hanya tersisa lebih kurang 92.63 individu (Arifin, 1993). Situasi ini telah

mendorong Menteri Kehutanan menerbitkan Surat Keputusan Menteri No. 12/KPTS-II/1987 yang isinya melarang setiap bentuk eksploitasi dan perdagangan lola (*T. niloticus*).

Meskipun telah ada peraturan yang melarang penangkapan dan perdagangan *T. niloticus* dari populasi alam, penangkapan liar masih tetap terjadi. Tingkat eksploitasi terhadap *T. niloticus* telah menunjukkan tanda-tanda kritis bila dilihat dari aspek konservasi, baik dalam hal jumlah maupun ukuran. Hal ini dapat mengakibatkan rendahnya keanekaragaman genetik pada spesies tersebut. Kondisi tersebut akan memberikan dampak pada rendahnya kemampuan adaptasi kerang lola terhadap perubahan yang terjadi di habitatnya. Oleh karena itu, upaya konservasi *T. niloticus* di tingkat pelaksanaan harus lebih diintensifkan.

Langkah awal dalam upaya konservasi organisme, termasuk *T. Niloticus*, memerlukan berbagai informasi seperti ekologi, sosio-ekonomi, taksonomi dan juga informasi genetik pada organisme dimaksud. Informasi tersebut sangat diperlukan dalam rangka menentukan metode konservasi yang tepat. Dalam upaya untuk memperoleh informasi genetik pada *T. niloticus* perlu dilakukan studi mengenai analisis genetik *T. niloticus*. Studi ini penting untuk mempelajari variasi genetik dan struktur populasi hewan tersebut.

Informasi mengenai variasi genetik *T. niloticus* sangat berguna bagi usaha konservasi dan manajemen sumberdaya hayati karena dengan mengetahui keanekaragaman genetiknya dapat dilakukan pendugaan kemampuan respon *T. niloticus* terhadap seleksi yang terjadi.

Informasi genetik pada hewan disimpan dalam DNA inti dan DNA organel (mitokondria dan kloroplas). Kedua jenis DNA tersebut tersusun dari polinukleotida. Basa nukleotida pada DNA dapat mengalami perubahan. Perubahan basa nukleotida pada sekuens DNA genom dapat terjadi karena adanya peristiwa delesi, inversi, translokasi dan transposisi. Perubahan tersebut tidak selalu diikuti oleh perubahan fenotipe sehingga penggunaan karakter morfologi untuk analisis variasi genetik memiliki keterbatasan. Perkembangan biologi molekuler telah memungkinkan molekul untuk digunakan sebagai penanda pada analisis variasi genetik atau analisis struktur genetika populasi. Molekul yang dapat digunakan sebagai marka genetik adalah protein dan DNA. Aplikasi DNA sebagai penanda genetik memiliki beberapa keuntungan, seperti tidak dipengaruhi oleh lingkungan, dapat dianalisis pada hewan yang sangat muda, dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan yang tidak dapat dideteksi oleh karakter morfologi dan dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh seleksi dan mutasi. Lebih dari itu, penanda DNA lebih sensitif daripada penanda protein (Iguchi *et al.*, 1999).

Pewarisan mtDNA biasanya bersifat maternal; sperma hanya memberikan kontribusi sebesar 50 molekul terhadap telur yang mengandung 10^5 copy mtDNA maternal (Randi, 2000). Menurut Zischler (1999) meskipun mitokondria sperma mammalia masuk ke dalam ovum, mitokondria jantan tidak dapat dilacak segera setelah fertilisasi.

Perbedaan transmisi antara mtDNA dan DNA inti mengakibatkan kedua DNA tersebut merefleksikan perbedaan aspek sejarah dan biologi populasi (Sunnuck, 2000). Selain itu, mtDNA memiliki laju mutasi lebih tinggi daripada laju mutasi DNA inti (Randi, 2000). Keadaan tersebut telah mendorong penggunaan mtDNA secara luas dalam studi struktur populasi dan kekerabatan filogenetik antarspesies (Avice *et al.*, 1987).

Mitokondria DNA hewan, baik invertebrata maupun vertebrata, tidak mempunyai intron, mempunyai sekuens intergen yang kecil, dan memiliki daerah kontrol (Moritz *et al.*, 1987). Menurut Randi (2000) daerah kontrol merupakan bagian utama sekuens nonpenyandi (*noncoding sequence*). Bagian ini pada vertebrata disebut *D-loop*, sedangkan pada invertebrata disebut bagian kaya A-T (*A-T rich region*). Selain sekuens nonpenyandi, mtDNA juga mengandung dua DNA ribosomal, 22 tRNA, dan 13 gen penyandi protein yang mengkode subunit enzim yang berfungsi pada transpor elektron.

Salah satu gen penyandi protein yang terdapat pada mtDNA adalah gen sitokrom c oksidase I (COI). Gen tersebut telah umum digunakan sebagai penanda genetik pada studi populasi. Hal ini karena gen COI memiliki laju mutasi yang cukup tinggi sehingga dapat memperlihatkan perbedaan antarpopulasi atau bahkan antarindividu dalam satu spesies (Bucklin *et al.*, 2003). Bahkan, menurut Hebert *et al.* (2003a), gen COI memiliki laju mutasi yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan laju mutasi dua gen mitokondria lain seperti 12S dan 16 S rDNA. Lebih dari itu, gen COI telah terbukti dapat digunakan untuk studi analisis populasi (Luttikhuisen *et al.*, 2003; Shefer *et al.*, 2004; Duran *et al.*, 2005).

Penggunaan DNA sebagai marka genetik semakin pesat dengan dikembangkannya metode amplifikasi DNA secara *in vitro* yang disebut teknik *polymerase chain reactions* (PCR). PCR merupakan metode yang baik dan cepat untuk amplifikasi DNA. Namun, ada beberapa faktor yang harus diperhatikan untuk keberhasilan proses amplifikasi ini seperti konsentrasi DNA, panjang primer, komposisi basa primer, dan temperatur hibridisasi primer (Tingey *et al.*, 1992).

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat keanekaragaman genetik *T. niloticus* berdasarkan atas sekuens parsial gen sitokrom COI dan menguji kelayakan gen sitokrom COI sebagai marka genetik.

Materi dan Metode

Pegambilan sampel *T. niloticus* dilakukan sejak 17 sampai dengan 28 Mei 2004 menggunakan metode survei. Sampel *T. niloticus* diambil dari perairan kepulauan Spermonde Sulawesi Selatan. Jaringan diawetkan dalam etanol absolut dan kemudian disimpan pada suhu 4°C. Analisis mtDNA dilakukan di Laboratorium Biotechnologie und Molekular Genetik, FB2-UFT, Universität Bremen, Jerman.

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan *T. niloticus*, proteinase-K, agarosa, primer, *DNA markers*, *Chelex*® 100 5% dan *dithiotreitol* (DTT). Alat yang digunakan adalah *microcentrifuge*, mesin PCR, alat elektroforesis, pipet mikro, pH-meter, *UV transluminator*, mesin sekuensing (ABI 310, PE Applied Biosystem), dan kamera polaroid.

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan atas metode *Chelex*® menurut prosedur Walsh *et al.* (1991). DNA genom diperoleh dari lebih kurang 0,50 mg potongan jaringan. Fragmen gen sitokrom COI sepanjang 750 pb diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reactions* (PCR) dengan primer mengikuti Folmer *et al.* (1994), yaitu LCO 1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' sebagai *forward primer* dan HCO 2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' sebagai *reverse primer*. PCR dilakukan dalam volume total reagen sebanyak 50 µl yang mengandung 200 hingga 1000 ng DNA total. Konsentrasi akhir masing-masing reagen adalah sebagai berikut: 1x *manufacturer polymerase buffer* (Promega), 3 mM MgCl₂, 0,03 µM masing-masing primer, 0,20 mM masing-masing dNTPs dan 0,20 µl *Taq polymerase*. Siklus termal mengikuti Hebert *et al.* (2003 b) dengan sedikit modifikasi, yaitu 1 menit pada 94°C; diikuti oleh lima siklus PCR (94°C, 1 menit; 41°C, 1,5 menit, dan 72°C, 1,5 menit); diikuti lagi oleh 35 siklus PCR (94°C, 1 menit, 52°C, 1,5 menit, dan 72°C, 1,5 menit); dan diakhiri dengan 5 menit pada 72°C untuk pemanjangan primer lebih lanjut. Produk PCR dimigrasikan pada elektroforesis gel agarosa 1% dan diwarnai dengan etidium bromid selama 35 menit, kemudian divisualisasikan menggunakan kamera polaroid di bawah sinar ultraviolet (UV). Produk PCR dengan hasil yang jernih dan spesifik selanjutnya disekuens dengan terlebih dahulu dilakukan *cycle-PCR*. Sekuensing dan elektroforesis dilakukan dalam *automated sequencer ABI Prisma 310* (PE Applied Biosystem).

Analisis data *fluorescence* dilakukan menggunakan *software Sequence Analysis*. Pengujian lebih lanjut dan *editing* secara manual dilakukan menggunakan program

“Sequence Navigator”. Selanjutnya, sekuens basa nitrogen disejajarkan menggunakan program MEGA versi 2.0.

Hasil dan Pembahasan

Kepulauan Spermonde Sulawesi Selatan dibagi menjadi 3 *cluster*, yaitu *innershelf*, *midleshelf*, dan *outershelf*. Selama lebih kurang 2 minggu pengambilan sampel, dari 12 pulau yang disurvei di Kepulauan Spermonde hanya diperoleh spesimen sebanyak 4 individu *T. niloticus*, yaitu dari pulau Reang-reang dan Lumu-lumu (*midleshelf*). Sedikitnya jumlah individu yang terkoleksi menunjukkan bahwa populasi *T. niloticus* di Kepulauan Spermonde sudah sangat kritis.

```
Trochus_niloticus_1  GGGGACTGCT CTTAGATTAT TGATTTCG-AG CTGAACTTGG TCAGCCTGGC
Trochus_niloticus_2  GGGGACTGCT CTTAGATTAT TGATTTCGCAG CTGAACTTGG TCAGCCTGGC

Trochus_niloticus_1  GCGTTGTTAG GGGATGATCA ATTATATAAT GTAATTGTTA CTGCTCATGC
Trochus_niloticus_2  GCGTTGTTAG GGGATGATCA ATTATATAAT GTAATTGTTA CTGCTCATGC

Trochus_niloticus_1  ATTTGTTATA ATTTTTTTCT TAGTAATACC TTTAATAATT GGGGGATTTCG
Trochus_niloticus_2  ATTTGTTATA ATTTTTTTCT TAGTAATACC TTTAATAATT GGGGGATTTCG

Trochus_niloticus_1  GTAATTGATT AATTCCTTTA ATATTAGGGG CTCCAGACAT AGCATTTC-CC
Trochus_niloticus_2  GTAATTGATT AATTCCTTTA ATATTAGGGG CTCCAGACAT AGCATTTCGCC

Trochus_niloticus_1  ACGTCTTACT ATAACATAAG TTTCTGATTG TTACCTCCTT CCTTGACTTT
Trochus_niloticus_2  ACGTCTTA-- ATAACATAAG TTTCTGATTG TTACCTCCTT CCTTGACTTT

Trochus_niloticus_1  ATTATTAAGA TCAGCTGCAG TGGAAAGAGG AGTGGGGACG GGTGAACAG
Trochus_niloticus_2  ATTATTAAGA TCAGCTGCAG TAGAAAGAGG AGTGGGGACG GGTGAACAG

Trochus_niloticus_1  TGTATCCCC TCTTGCAGGA AATTTAGCTC ATGCTGGTGC GTCAGTTGAT
Trochus_niloticus_2  TGTATCCCC TCTTGCAGGA AATTTAGCTC ATGCTGGTGC GTCAGTTGAT

Trochus_niloticus_1  TTAGCCATTT TTTCTCTTCA TTTAGC-TGG GGTGTCTTC- TATTTTAGGT
Trochus_niloticus_2  TTAGCCATTT TTTCTCTTCA TTTAGCCTGG GGTGTCTTCC TATTTTAGGT

Trochus_niloticus_1  GCTGTTAATT TTATTACTAC GGTAATCAAT ATGCGATGAT A-TGGGATAA
Trochus_niloticus_2  GCTGTTAATT TTATTACTAC GGTAATCAAT ATGCGATGAT ACTGGGATAA

Trochus_niloticus_1  AATTTGAAC- GGCTACCTTT ATTTGTC-TG ATCAGTAAAG ATTACGGCGA
Trochus_niloticus_2  AATTTGAACC GGCTACCTTT ATTTGTCCTG ATCAGTAAAG ATTACGGCGA

Trochus_niloticus_1  TTCCTGTTGC TGCTTTCTTT ACCCGTTTTA GCT
Trochus_niloticus_2  TTCCTGTTGC TGCTTTCTTT ACCCGTTTTA GCT
```

Gambar 1. Sekuens gen sitokrom c oksidase I dari dua spesimen *T. niloticus*
Figure 1. Sequence of cytochrom c oxydase I gene from two specimens of *T. niloticus*

Hasil survei ini tidaklah mengejutkan bila dikaitkan dengan kondisi Kepulauan Spermonde yang masih berstatus sebagai wilayah bebas (saat survei). Bahkan, di area perlindungan pun kepadatan *T. niloticus* sudah sangat rendah, misalnya di Taman Nasional Laut Sulawesi Tenggara yang memiliki kepadatan *T. niloticus* hanya kurang lebih 0,42/ha (Arifin, 1993). Lebih lanjut Arifin (1993) menyatakan bahwa populasi *T. niloticus* di Indonesia telah dipengaruhi oleh *overfishing*. Selain itu, berdasarkan atas pengamatan penulis, rendahnya populasi *T. niloticus* di Kepulauan Spermonde juga terjadi karena praktek penangkapan ikan yang tidak ramah lingkungan seperti pemboman terumbu karang dan

penggunaan potasium. Pemboman terumbu karang selain merusak habitat *T. niloticus* juga dapat membunuh baik organisme target maupun non-target secara langsung (Pet-Soede dan Erdman, 2004).

DNA hasil ekstraksi nampak terdegradasi. Hal ini diduga karena preservasi jaringan dilakukan menggunakan etanol 95% (absolut). Namun, karena analisis genetik dilakukan dengan metode amplifikasi (PCR), maka preservasi menggunakan etanol absolut masih cukup baik. Tidak demikian halnya jika analisis genetik dilakukan menggunakan marka *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) atau *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Analisis kedua marka ini memerlukan DNA total yang cukup baik sehingga preservasi jaringan sebaiknya dilakukan menggunakan nitrogen cair atau DNA diisolasi dari jaringan segar.

Dalam penelitian ini, preservasi menggunakan nitrogen cair tidak mungkin dilakukan karena kesulitan teknis. Jaringan sampel dianalisis di Laboratorium Biotechnologie und Molekular Genetik, FB2-UFT, Universität Bremen Jerman. Sampel dibawa dengan transportasi udara, dan penggunaan nitrogen cair tidak diizinkan oleh asosiasi penerbangan internasional karena bersifat eksplosif.

Dari empat DNA hasil ekstraksi yang diamplifikasi, hanya dihasilkan dua produk PCR. Produk PCR yang diperoleh memiliki panjang sesuai dengan yang diharapkan, yaitu lebih kurang 750 pb dan tidak ada perbedaan panjang di antara kedua individu.

Setelah membuang situs primer, situs yang meragukan, dan situs yang hilang, dari sepanjang 750 pb produk PCR diperoleh sekuens basa nitrogen sepanjang 533 pb untuk masing-masing spesimen *T. niloticus* (Gambar 1). Dengan merujuk kepada kemiripan sekuens NCBI BLAST terhadap sekuens yang ada di pangkalan data (*GeneBank*), terbukti bahwa sekuens yang diperoleh dari sampel memiliki homologi sebesar 70% dengan sekuens gen sitokrom c oksidase I dari kelompok gastropoda. Hal ini sekaligus membuktikan bahwa sekuens yang dihasilkan benar-benar merupakan target yang diharapkan.

Dari kedua sekuens gen COI yang diperoleh, terdeteksi 12 situs polimorfik yang menghasilkan dua haplotipe dengan nilai keanekaragaman 1. Polimorfisme mencakup 3 transposisi dan 9 delesi. Kondisi ini menunjukkan tingginya keanekaragaman genetik *T. niloticus* berdasarkan atas marka gen COI. Polimorfisme dan keanekaragaman genetik yang tinggi pada gen sitokrom COI juga ditemukan pada beberapa invertebrata laut lainnya (Duran *et al.*, 2005; Barber *et al.*, 2002). Namun, sesuai tidaknya kondisi tersebut dengan kondisi sebenarnya di alam, masih sulit untuk diterima karena kecilnya jumlah sampel yang ada. Akan tetapi, paling tidak dari hasil ini dapat diketahui bahwa gen COI dapat dijadikan sebagai marka genetik dalam studi genetika populasi dan taksonomi, bahkan sampai dengan tingkat spesies. Hal ini sesuai dengan pendapat Hebert *et al.* (2003a dan b) bahwa sekuens COI mampu memisahkan spesies yang berkerabat dekat dari hampir semua filum secara reguler kecuali pada *Cnidaria*. Lebih lanjut dinyatakan bahwa fragmen gen COI memiliki kisaran filogenetik dengan spektrum yang luas. Sementara itu, Bucklin *et al.* (2003) menyatakan bahwa COI memiliki laju perubahan sekuens yang tinggi dan memperlihatkan adanya divergensi sekuens intraspesies. Pada filum moluska, rata-rata divergensi sekuens COI sebesar 11,10%.

Dari sisi konservasi skala kecil, tingginya tingkat keanekaragaman genetik *T. niloticus* cukup menguntungkan. Namun, karena kedua spesimen berasal dari lokasi yang sama dan jumlah sampelnya yang kecil, informasi ini belum dapat dijadikan masukan yang berarti dalam upaya konservasi dengan skala yang lebih luas. Hal tersebut karena dari hasil ini belum diperoleh informasi mengenai hubungan genetik dan distribusi genetik antarpopulasi.

Kesimpulan

Berdasarkan atas hasil dan pembahasan tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa *Trochus niloticus* memiliki keanekaragaman genetik yang cukup tinggi. Selain itu, fragmen gen sitokrom c oksidase I cukup baik untuk digunakan sebagai marka genetik.

Daftar Pustaka

- Arifin, Z. 1993. Geographical distribution, habitat and fishery of top shell (*Trochus niloticus*) in Maluku. *Perairan Maluku dan Sekitarnya*, Ambon 8: 93-101.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb and N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridges between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Barber, P.H., S.R. Palumbi, M.V. Erdmann and M.K. Moosa. 2002. Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopod) indicate limits to larval transport: patterns, causes and consequences. *Molecular Ecology* 11: 659-674.
- Bucklin, A., B.W. Frost, J. Bradford-Grieve, L.D. Allen and N.J. Copley. 2003. Molecular systematic and phylogenetic assessment of 34 calanoid copepod species of the calanidae and clausocalanidae. *Marine Biology* 142: 3333-3343.
- Duran, S., C. Palacin, M.A. Becerro, X. Turon and G. Giribet. 2005. Genetic diversity and population genetic of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology* 13: 3317-3328.
- Folmer, O, M. Black, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3 (5): 294-299.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham and J.R. deWaard. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (suppl.)* 270: s96-s99.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. deWaard. 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Iguchi, K., Y. Tanimura, H. Takeshima and M. Nishida. 1999. Genetic variation and geographic population structure of amphidromus ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Journal Fisheries Sciences* 65: 63-67.
- Luttikhuisen, P.C., J. Drent and A.J. Baker. 2003. Disjunct distribution of highly divergent mitochondrial lineage clade and population subdivision in marine bivalve with pelagic larval dispersal. *Molecular Ecology* 12: 2215-2229
- Moritz, C., T.E. Dowling and W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.

- Pet-Soede, L and M. Erdman. 2004. An overview and comparison of destructive fishing practice in Indonesia. <http://www.spc.org.nc/coatfish/news/lrf/4/Erdman.htm>, diakses 20 Januari 2004
- Randi, E. 2000. Mitochondrial DNA. In J.A. Baker (Ed). Molecular Methods in Ecology. Blackwell Science, Toronto.
- Shefer, S., A. Abelson, O. Mokady and E. Geffen. 2004. Red to Mediterranean Sea bioinvasion: natural drift through the Suez Canal, or anthropogenic transport? *Molecular Ecology* 12: 2333-2343.
- Sunnuck, P. 2000. Efficient genetic marker for population biology. *TREE* 15 (5): 199-203.
- Tingey, S.V., J.A. Rafalski and J.G.K. Williams. 1992. Genetic Analysis with RAPD Marker. Joint Plant Breeding Symposia Series, November 1, 1992. Minneapolis, Minnesota.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger and R. Higushi. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (4): 506-513.
- Zischler, H. 1999. Mitochondrial DNA: Diversity Analysis and Possible Pitfalls. In J.T. Epplen and T. Lubjuhn (Ed). *Methods and Tools in Biosciences and Medicine DNA Profiling and DNA Fingerprinting*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland.