

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Struktur Populasi Ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) Dengan Analisis DNA Mikrosatelit Di Perairan Samudera Hindia

Population Structure of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) Of Indian Ocean Based on Microsatellite DNA Analysis

Andi Bahtiar¹, Made Pharmawati^{2*}, I Gusti Ngurah Kade Mahardika³

¹ Program studi Magister Ilmu Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

² Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali

³ Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, , Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

*Email: made_pharmawati@unud.ac.id

INTISARI

Tuna mata besar (*Thunnus obesus*) adalah salah satu target utama tuna longline Indonesia di Samudera Hindia akibatnya intensitas penangkapan tuna mata besar di Samudera Hindia mengalami peningkatan sehingga perlu adanya pengelolaan dan pemanfaatan secara berkesinambungan dalam waktu jangka panjang. Informasi genetik pada ikan dengan migrasi yang tinggi seperti tuna sangat penting diketahui untuk pemanfaatan yang bersifat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi struktur populasi tuna mata besar di Samudera Hindia dengan analisis DNA mikrosatelit. Sebanyak 30 sampel jaringan sirip dari tuna mata besar dikumpulkan dari dua lokasi di Samudera Hindia (barat Sumatera dan selatan Nusa Tenggara) selama Desember 2015 sampai dengan Mei 2016. Metode yang digunakan adalah analisis mikrosatelit yang terdiri dari ekstraksi, purifikasi, amplifikasi DNA dengan polymerase chain reaction (PCR), elektroforesis dan analisis fragmen. Hasil analisis terhadap 3 lokus DNA mikrosatelit menunjukkan bahwa tingkat kekerabatan kedua kelompok sampel relatif dekat yaitu sebesar 0,7518%, Hal ini menunjukkan bahwa populasi tuna mata besar (*Thunnus obesus*) di Samudera Hindia barat Sumatera dan Samudera Hindia selatan Nusa Tenggara masih dalam satu populasi dan berasal dari populasi induk yang sama.

Kata kunci: DNA mikrosatelit, Samudera Hindia, struktur populasi, tuna mata besar

ABSTRACT

Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) is among main targets of Indonesian longline tuna fisheries causing the increase of tuna fishing intensity, especially in the Indian Ocean, urging sustainable management of tuna fisheries. Genetic information on highly migrated fish, such as tuna, is very much important to support sustainable fishing industry. This study was aimed to obtain information on bigeye tuna population structure in the Indian Ocean through microsatellite DNA analysis. Thirty samples of bigeye tuna fin tissues were collected from two locations in the Indian Oceans, i.e. West of Sumatra Island and South of Nusa Tenggara Islands, from December 2015 to May 2016. Microsatellite DNA analysis used in this study was consisted of DNA extraction, purification, DNA amplification using polymerase chain

reaction (PCR), electrophoresis and fragment analysis. The microsatellite DNA analysis was conducted using 3 DNA loci. The results showed that the genetic relationship of the two groups of samples was 0.7518%, indicating relatively close relationship, which leads to further conclusion that both bigeye tuna populations in the West of Sumatra and in the South of Nusa Tenggara are originated from the same parent population.

Keyword: bigeye tuna, Indian Ocean, microsatellite DNA, population structure,

PENDAHULUAN

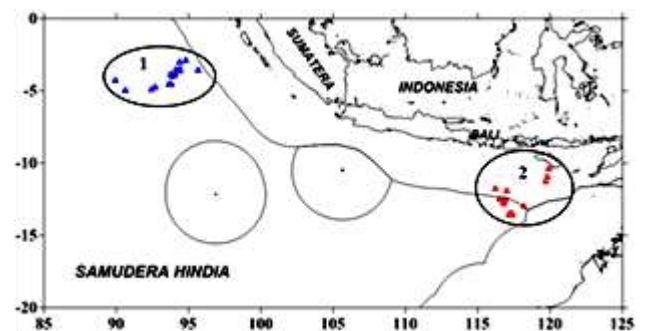
Tuna mata besar (*Thunnus obesus*) merupakan salah satu sumber daya ikan bernilai ekonomis penting di dunia dan merupakan komoditi perikanan terbesar ketiga di Indonesia setelah udang dan ikan demersal (Habibi *et al.*, 2011). Tuna mata besar menjadi salah satu target utama perikanan longline Indonesia sejak diperkenalkannya longline tuna dalam pada pertengahan 1980-an (Sadiyah *et al.*, 2011). Ikan tuna merupakan komoditi ekspor yang sangat menjanjikan bagi perekonomian Indonesia hal ini mengakibatkan intensitas penangkapan tuna mata besar di Samudera Hindia tergolong tinggi (Jatmiko *et al.*, 2014) walaupun secara global di Samudera Hindia dalam keadaan baik (IOTC, 2013; ISSF, 2013) namun demikian, tuna mata besar adalah salah satu spesies tuna yang paling tereksplorasi di Indonesia (ICCAT, 2005; IUCN, 2014), sehingga akan memburuk jika sumber daya ini tidak dikelola dengan baik (Chiang *et al.*, 2008).

Beberapa hasil penelitian sebelumnya sudah menjelaskan kondisi genetika populasi tuna mata besar dengan menggunakan metode yang berbeda-beda seperti PCR-RFLP (Alvarado-Bremer *et al.*, 1998; Nugraha, 2009), sekuens mitokondria (Bartlet & Davidson, 1991; Chiang *et al.*, 2008; Pertiwi *et al.*, 2014), dan mikrosatelit DNA (Durand *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008). Sehubungan dengan penjelasan diatas maka dapat disimpulkan bahwa penelitian tentang struktur populasi ikan tuna mata besar menggunakan metode mikrosatelit masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis adanya kemungkinan perbedaan struktur populasi tuna mata besar di Samudera Hindia barat Sumatera dengan selatan Nusa Tenggara.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel

Pengumpulan sampel jaringan dilakukan secara langsung selama mengikuti kapal rawai tuna yang beroperasi di Samudera Hindia (7° LS dan 97° BT) dan (11° LS dan 114° BT) (Gambar 1). Sampel jaringan dari masing-masing lokasi berjumlah 15 buah, sehingga total terdapat 30 sampel. Bagian yang jaringan yang diambil adalah potongan ujung sirip ekor sepanjang 1 - 2 cm sehingga tidak mengurangi kualitas ikan hasil tangkapan, selanjutnya sampel disimpan ke dalam botol yang telah diisi larutan etanol 96 % (Walsh *et al.*, 1991). Ekstraksi DNA dan analisis PCR terhadap 30 sampel tersebut dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol, Bali sedangkan analisis fragmen dilakukan di 1st Base – Singapura.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel populasi tuna mata besar. Biru=barat Sumatera; Merah=selatan Nusa Tenggara

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode chelex (Walsh *et al.*, 1991). Potongan sirip berukuran 0,2-0,5 cm dipindahkan ke dalam tabung mikro yang sudah berisi 250 μ l larutan chelex 10% dalam TE buffer dan ditambahkan 5 μ l larutan *Proteinase K* (PK), selanjutnya

tabung tersebut *divortex* selama 15 detik agar larutan tercampur, selanjutnya *diflashing* selama 5 detik untuk mengkonsentrasikan semua larutan agar terkumpul di dasar tabung mikro.

Sampel kemudian diinkubasi dalam *thermo block* pada suhu 55°C selama 2,5 jam dan setiap 1 jam sampel yang diinkubasi *divortex* agar jaringan mudah hancur, dan diinkubasi kembali pada suhu 89°C selama 8 menit. Selanjutnya sampel diangkat dan didinginkan pada suhu ruang selama 2 menit dan *dicentrifuge* selama 7 menit dengan kecepatan 13.000 rpm yang menghasilkan 2 lapisan dalam tabung. Lapisan atas yang berwarna bening disebut supernatan. Supernatan ini mengandung genom DNA sampel uji sedangkan lapisan bawah terdiri atas butiran larutan chelex-100, protein dan sisa jaringan lainnya. Supernatan diambil sebanyak 150 – 200 µl dan dimasukkan ke dalam tabung mikro baru yang telah diberi label. DNA genomik yang diperoleh disimpan dalam *freezer* -20°C untuk digunakan dalam tahap berikutnya.

Purifikasi DNA

PrepEase DNA Clean-Up Kit digunakan untuk purifikasi genom DNA. Sebanyak 100 µl hasil ekstraksi diambil dan dimasukkan ke tabung mikro dan ditambahkan 500 µl *binding buffer*. Campuran *divortex* dan selanjutnya *diflashing*. Campuran dibiarkan selama 5 menit pada suhu ruang, setelah itu dimasukkan ke dalam *column PrepEase DNA Clean-Up Kit* dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm dan suhu 4°C.

Larutan yang tersaring pada bagian kolom atas tabung mikro diambil menggunakan pipet dan dibuang. Selanjutnya larutan yang berada di kolom bawah ditambahkan larutan *wash buffer* sebanyak 600 µl, selanjutnya disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan dan suhu yang sama. Larutan yang tersaring pada kolom atas dibuang, kemudian kolom disentrifugasi kembali dengan waktu, suhu dan kecepatan sama. Kolom dipindahkan ke tabung mikro baru yang telah steril, ditambahkan larutan *elution buffer* sebanyak 30 µl dan disentrifugasi kembali.

Larutan yang telah tersaring merupakan DNA murni dan selanjutnya dimasukkan ke mesin *GeneQuant* sehingga dapat diketahui nilai konsentrasi DNA murni tersebut.

Amplifikasi DNA mikrosatelit

Amplifikasi DNA mikrosatelit pada inti sel DNA dilakukan dengan primer DNA mikrosatelit hasil kloning dari *Thunnus thynnus orientalis* di Jepang (Takagi *et al.*, 1999), yaitu terdiri dari *Ttho-1* dengan kisaran ukuran produk 175-191 pasang basa (bp), *Ttho-4* kisaran 140-152 bp dan *Ttho-7* 188-218 (Tabel 1).

Proses amplifikasi PCR dilakukan dengan memasukkan TopTaq Master Mix sebanyak 12,5 µl ke dalam tabung PCR, kemudian ditambahkan 0,5 µl primer F, 0,5 µl primer R dan 2 µl *DNA template*, dan H₂O sehingga total volume reaksi 25 µl.

Tabung PCR tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan konfigurasi suhu amplifikasi yang digunakan adalah sebagai berikut: pra-denaturasi (15 menit pada suhu 95°C) sebanyak 1 siklus, dilanjutkan dengan denaturasi (1 menit pada suhu 94°C), penempelan primer/*annealing* (30 detik pada suhu 52°C), pemanjangan fragmen/*extention* (30 detik pada suhu 72°C) sebanyak 35 siklus. Untuk penyempurnaan, tahap akhir pemanjangan (*final extention*) dilakukan selama 30 detik pada suhu 72°C dan tahap penyimpanan pada suhu ruang 24°C selama 1 menit

Elektroforesis

Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1,5% dalam 10x TBE buffer, pada tegangan 100 Volt, selama 27-30 menit. Selanjutnya visualisasi fragmen DNA dilakukan menggunakan transluminator ultraviolet (UV) dan didokumentasi dengan *polaroid gel camera*. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa, yaitu suatu bahan semi-padat berupa polisakarida yang dilarutkan dalam suatu buffer (Yuwono, 2006). Selanjutnya hasil PCR dikirim ke fasilitas analisis fragmen (1st BASE, Singapura) untuk penentuan ukuran fragmen.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi mikrosatelit

No	Primer	Sekuens	Repeat	Annealing
1	<i>Ttho-1</i>	F= TTCTGCTTCTTTCTTCTGG	GT	52
		R= GAAAACACGGGATTATGG		
2	<i>Ttho-4</i>	F= CCTTCATCTTCAGTCCCATC	CA	52
		R= CTGTTTCATCTGTTTCGCC		
3	<i>Ttho-7</i>	F= ACTGGATGAAAGGCGATTAC	CA	52
		R= ACAGAGGAGCATAACAGAAAC		

Analisis Fragmen

Analisis fragmen DNA dilakukan dengan alat *Applied Biosystems Genetic Analyzer* dan kemudian diinterpretasikan dengan menggunakan perangkat lunak analisis GeneMapper v 4.0. Perbedaan jarak genetik (*genetic distance*) dihitung berdasarkan persamaan Nei (1978) dengan bantuan program GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Program Arlequin versi 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), digunakan untuk menganalisis indikator keragaman DNA (*molecular diversity indices*) dan struktur genetik. Perhitungan struktur genetik meliputi Analysis of Molecular Varians (AMOVA) untuk mengetahui variasi genetik dan analisis perbandingan sampel genetik populasi (*comparisons of population samples*) untuk mengetahui struktur populasi antara kelompok populasi tuna mata besar.

HASIL

Hasil analisis 3 lokus DNA mikrosatelit menunjukkan bahwa kedua kelompok sampel terdeteksi menghasilkan 59 alel, dengan rata-rata kelimpahan alel 9,83 dan frekuensi alel antara 0,033 – 0,667 (Tabel 2).

Tabel 2. Frekuensi dan panjang alel sampel tuna mata besar pada masing-masing lokus DNA mikrosatelit

Lokus	Alel	Frekuensi	
		Populasi 1	Populasi 2
<i>Ttho - 1</i>	181	0.033	0.067
	185	0.033	0.000
	187	0.667	0.467
	189	0.167	0.267
	191	0.000	0.100

<i>Ttho - 4</i>	193	0.000	0.067
	195	0.033	0.033
	197	0.067	0.000
	139	0.167	0.033
	141	0.067	0.100
	143	0.100	0.000
	145	0.000	0.100
	147	0.067	0.100
	149	0.400	0.333
	151	0.033	0.133
<i>Ttho - 7</i>	153	0.100	0.000
	157	0.033	0.000
	159	0.000	0.100
	161	0.033	0.033
	163	0.000	0.067
	197	0.133	0.000
	199	0.067	0.033
	201	0.033	0.067
	205	0.000	0.033
	207	0.067	0.000
	211	0.033	0.033
	213	0.100	0.200
	215	0.033	0.067
	217	0.067	0.233
	219	0.033	0.067
	221	0.067	0.000
	223	0.067	0.100
	225	0.067	0.033
227	0.067	0.000	
229	0.000	0.067	
231	0.100	0.000	
233	0.000	0.033	
235	0.033	0.000	
247	0.033	0.033	

Jarak genetik antara kelompok sampel tuna mata besar di Samudera Hindia ditampilkan pada Tabel 3, sedangkan analisis variasi genetik menggunakan perhitungan AMOVA ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Jarak genetik antara populasi sampel tuna mata besar di Samudera Hindia

Populasi	Populasi 1	Populasi 2
Populasi 1	0,000	0,187
Populasi 2	0,187	0,000

Tabel 4. Hasil AMOVA berdasarkan nilai rerata lokus *Ttho-1*, *Ttho-4* dan *Ttho-7* pada populasi tuna mata besar

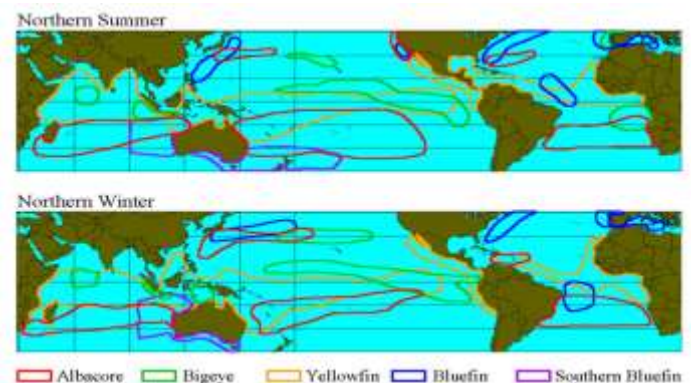
Variasi	Jumlah	Komponen	Persentase
	Kuadrat	Varian	Variasi
Diantara populasi	1,833	0,00913	0,75188
Diantara individu dalam populasi	43,667	0,35476	29,22524
Dalam individu	25,500	0,85000	70,02288
Total	71,000	1,21389	100

Data keragaman alel pada sampel kelompok 1 dan kelompok 2 dianalisis dengan bantuan program *Arlequin 3.5* dan menggunakan uji perbandingan sampel genetik populasi (*comparisons of population samples*). Hasil perhitungan F-statistik berupa nilai FIT, FST dan FIS secara berurutan yaitu 0,29, 0,01 dan 0,29, sedangkan nilai P dari FST sebesar $0,27 \pm 0,62$. Nilai P yang diperoleh menunjukkan kedua kelompok populasi tersebut tidak berbeda nyata (nilai $P > 0,05$) pada tingkat signifikan 95%.

PEMBAHASAN

Jarak genetik merupakan ukuran perbedaan genetik antar populasi atau famili yang dihitung berdasarkan frekuensi alel (Nei, 1978). Semakin kecil jarak genetik antar individu dalam populasi, maka populasi tersebut semakin seragam (Koh *et al.*, 1999). Nilai jarak genetik hasil penelitian ini lebih tinggi yaitu 0,187 dari hasil penelitian Nugraha *et al.* (2011) yaitu sebesar 0,0038. Meskipun begitu hasil lanjutan dengan program *Arlequin* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok populasi tuna mata besar. Tidak adanya perbedaan jarak genetik antara kedua kelompok sampel tersebut diduga karena secara geografis tidak ada batasan yang memungkinkan terjadinya pemisahan kelompok antara satu dengan yang lainnya, misalnya selat ataupun kepulauan.

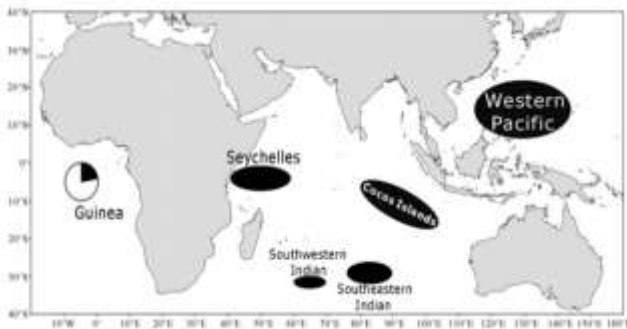
Keadaan ini menyebabkan proses migrasi dan pertukaran gen antar kelompok sampel dapat terjadi dengan mudah. Ikan tuna tergolong dalam jenis ikan oseanik dan beruaya jauh (*highly migratory species*), berenang ribuan mil setiap tahunnya melalui Zona Ekonomi Eksklusif (ZEE) dari negara-negara pantai dan melintasi wilayah laut bebas (Tajerin *et al.*, 2008). sebaran tuna di dunia pada waktu musim panas dan dingin di belahan bumi bagian utara (Gambar 2). Terlihat bahwa distribusi dan migrasi tuna mata besar di Samudera Hindia memiliki pola penyebaran yang luas baik untuk tujuan mencari makan (*feeding area*) maupun memijah (*spawning area*). Kelompok sampel tuna mata besar yang tertangkap di Samudera Hindia barat Sumatera memiliki pola perpindahan migrasi dengan kelompok sampel yang tertangkap di Samudera Hindia selatan Nusa Tenggara.



Gambar 2. Peta sebaran tuna di dunia (Nakamura 1969)

F-statistik berupa nilai FIT, FST dan FIS secara berurutan adalah 0,29, 0,01 dan 0,29, Nilai FIS tersebut menunjukkan besarnya perkawinan sedarah oleh individu yang terjadi pada suatu subpopulasi sebesar 29,9%. Nilai FIT menunjukkan tingkat keseluruhan dari perkawinan sedarah yang terjadi pada total populasi berkisar 29,4%. Nilai FIS < 0 menunjukkan bahwa *inbreeding* yang terjadi pada populasi masih rendah, sedangkan nilai FIS > 0 menunjukkan bahwa *inbreeding* yang terjadi lebih besar dari pada yang diharapkan pada suatu populasi (Keller & Waller, 2002).

Variasi molekuler (AMOVA) antara populasi tuna mata besar pada populasi 1 (satu) dan populasi 2 (dua) relatif kecil yaitu 0,75%, yang menunjukkan bahwa populasi tuna mata besar tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dan masih dalam satu struktur populasi (belum terpisah menjadi subpopulasi). Kedekatan kekerabatan diperkuat juga dengan adanya kesamaan induk beberapa sampel berdasarkan frekuensi alel tertinggi. Chiang *et al.* (2008) melaporkan bahwa tidak terdapat perbedaan struktur populasi tuna mata besar antara tuna mata besar di perairan kepulauan Cocos, Samudera Hindia timur laut, Samudera Hindia barat daya dan perairan Seychelles (Gambar 3). Adanya satu stok populasi tuna mata besar di Samudera Hindia membuat pengelolaan perikanan tuna tidak begitu kompleks untuk dilakukan baik oleh institusi lokal maupun organisasi pengelolaan perikanan regional (IOTC).



Gambar 3. Struktur genetik populasi tuna mata besar di berbagai lokasi perairan (Chiang *et al.* 2008)

KESIMPULAN

Hasil analisis menunjukkan bahwa populasi tuna mata besar di Samudera Hindia barat Sumatera serta selatan Nusa Tenggara masih dalam satu populasi dan berasal dari populasi induk yang sama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada staf Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol, Bali dan staf Loka Riset Perikanan Tuna Denpasar, Bali yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarado-Bremer, J.R., B. Stequart, N.W. Robertson, B. Ely. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus* Lowe) populations. *Marine Biology* 132: 547-557
- Chiang, H.C., C.C. Hsu, G.C.C. Wu, S.K. Chang & H.Y. Yang. 2008. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the Indian Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*. 90: 305-312.
- Durand, J.D., A. Collet, S. Chow, B. Guinand, P. Borsa. 2005. Nuclear and unidirectional gene flow of Indo-Pacific Atlantic bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations, and their admixture off southern Africa. *Marine Biology*. 147: 313-322
- Excoffier, L. & H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*. 10: 564-567.
- Gonzalez, E.G., P. Beerli., R. Zardoya. 2008. Genetic structuring and migration patterns of Atlantic bigeye tuna, *Thunnus obesus* (Lowe, 1839). *BMC Evolutionary Biology*. 8: 252 doi.org/10.1186/1471-2148-8-252
- Habibi, A., D. Ariyogagautama & Sugiyanta. 2011. Perikanan tuna – Panduan penangkapan dan penanganan. WWF-Indonesia. Versi 1. 26 pp.
- ICCAT. 2005. Report of the second world meeting on bigeye tuna. Madrid, Spain, March 10-13, 2004. 57, 2, 3-38.
- Indian Ocean Tuna Commission (IOTC). 2013. Report of the Fifteenth Session of the IOTC Working Party on Tropical Tunas. San Sebastian, Spain, 23–28 October 2013. 93 pp
- International Seafood Sustainability Foundation (ISSF). 2013. ISSF Tuna Stock Status Update, 2013(2): Status of the world fisheries for tuna. ISSF Technical Report 2013-04A. International Seafood Sustainability Foundation, Washington, D.C., USA. 88 pp.

- IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. (www.iucnredlist.org).
- Jatmiko, I., B. Setyadji & D. Novianto. 2014. Distribusi Spasial dan Temporal ikan Tuna Mata Besar (*Thunnus obesus*) di Samudera Hindia Bagian Timur. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 20(3): 32-44
- Keller, L. F. and D. M. Waller. 2002. Inbreeding Effect in Wild Population. *TRENDS In Ecology & Evolution*. 17(5): 230 – 241.
- Koh, T.L., G. Khoo., L.Q Fan & V.P.E. Phang. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of discus (*Symphysodon* spp) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*. 173: 485-497.
- Nakamura, H. 1969. Tuna Distribution and Migration. Fishing News Book Ltd. London.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterogeneity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nugraha, B. 2009. Studi tentang genetika populasi ikan tuna mata besar (*Thunnus obesus*) hasil tangkapan tuna longline yang didaratkan di Benoa (Tesis). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Nugraha, B., Novianto, D., Barata, B. 2011. Keragaman genetik ikan tuna mata besar (*Thunnus obesus*) di Samudera Hindia. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 2(5): 291-292.
- Peakall, R & Smouse, PE. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pertiwi, N.P.T., A. Sembiring, A. Mahardini, N.K.D. Cahyani, A.W. Anggoro, B. Nugraha, R.K. Sulistyaningsih, J. Jatmiko, G.N. Mahardika. 2014. Struktur populasi tuna mata besar (*Thunnus obesus*) di kepulauan Indo-Malaya: analisis *control region*, DNA mitokondria. *Naskah Lengkap Simposium Nasional Pengelolaan Perikanan Tuna Berkelanjutan*. Bali 10 – 11 Desember 2015
- Sadiyah, L., N. Dowling, B.I. Prisantoso. 2011. Changes in Fishing Pattern from Surface to Deep Longline Fishing by the Indonesian Vessels Operating in the Indian Ocean. *Indonesian Fisheries Research Journal*. 17: 87–99
- Tajerin, Muhajir & Sastrawidjaja. 2008. Kondisi Usaha Tuna Indonesia : Sumberdaya, Permasalahan dan Pemberdayaannya. Meningkatkan kinerja usaha dan perdagangan tuna. Balai Riset Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta. pp: 1 – 34.
- Takagi M., T. Okmura, S. Chow & N. Taniguchi N. 1999. PCR Primers for Microsatellite Loci in Tuna Species of the Genus *Thunnus* and Its Application for Population Genetics Study. *Fisheries Science*. 65: 571–576.
- Walsh, P.S., D.A. Metzger & R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR Based Typing From Forensic Material. *Biotechniques*. 10(4): 506-513.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction, C.V. Andi: Yogyakarta.