

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan Lais *Cryptopterus* spp. yang didapatkan dari S. Kampar dan Indragiri terdiri dari *C. limpok* dan *C. apogon*. Isolasi DNA total dilakukan terhadap cuplikan otot ikan Lais *Cryptopterus* spp.

Amplifikasi Gen Sitokrom b

Hasil isolasi DNA total dari cuplikan otot ikan Lais *C. limpok* dari S. Kampar (LJK) dan dari S. Indragiri (LJI); *C. apogon* dari S. Kampar (LPLK) dan dari S. Indragiri (LPLI) digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen sitokrom b DNA mitokondria dengan teknik PCR. Amplifikasi gen sitokrom b menggunakan primer *forward* (F) L14841 dan primer *reverse* (R) H15149. Posisi penempelan primer yang mengamplifikasi fragmen gen sitokrom-b *Cryptopterus* spp. disajikan pada Lampiran 1. Hasil amplifikasi ini menghasilkan fragmen DNA mitokondria berukuran 373 pb (diacu kepada sitokrom-b utuh *C. minor* (*GenBank*) nomor akses AY458895). Kocher *et al.* (1989) mendapatkan ukuran fragmen sitokrom b DNA mitokondria yang diamplifikasi dengan primer L14841 dan H15149 pada burung, ikan dan rodensia adalah lebih pendek yaitu sepanjang 307 pb. Berdasarkan runutan gen sitokrom-b utuh (1141 pb) pada DNA mitokondria *C. minor* (Wilcox *et al.* 2004) yang digunakan sebagai pembandingan, fragmen ini terletak di dalam gen sitokrom-b yaitu pada basa ke 61 sampai dengan basa ke 433. Fragmen ini diapit oleh primer L14841 dan H15149.

Runutan Nukleotida Gen Sitokrom-b

Fragmen gen sitokrom-b (parsial) *Cryptopterus* spp. dari S. Kampar dan S. Indragiri Riau yang diperoleh sepanjang 373 pb, dilakukan perunutannya menggunakan primer *forward* L14841 dan primer *reverse* H15149 dengan mesin perunut DNA otomatis *ABI Prism versi 3.7* (USA). Berdasarkan runutan yang diperoleh, maka dilakukan penjajaran berganda (*multiple allignment*) yang dibandingkan dengan runutan-runutan gen sitokrom-b *Cryptopterus* yang ada di *GenBank*. Runutan DNA yang diperoleh dari hasil penjajaran berganda tersebut adalah 159 nukleotida (Lampiran 2), yaitu pada posisi ke 184 sampai dengan

posisi ke 342 (diacu kepada sitokrom-b utuh *C. minor*). Bagian runutan fragmen yang tidak terbaca yaitu 123 nukleotida dari ujung 5' primer L14841 dan 91 nukleotida dari ujung 5' primer H15149. Seratus lima puluh sembilan nukleotida ini menyandi 53 asam amino (Lampiran 3).

Keragaman Runutan Nukleotida

Komposisi nukleotida gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp. disajikan pada Tabel 1. Rata-rata nukleotida C adalah yang paling banyak ditemukan (28,5%), diikuti oleh nukleotida T (28,3%), A (26,5%) dan rata-rata yang paling sedikit ditemukan adalah G (16,7 %). Rata-rata komposisi nukleotida A+T pada *Kryptopterus* spp. adalah lebih banyak (54,8%) daripada rata-rata nukleotida G+C (45,2%). Komposisi A+T paling banyak ditemukan pada *C. schilbeides* (GenBank) yaitu 58,4% dan paling sedikit ditemukan pada *C. cryptopterus* (GenBank) yaitu 51,5%. Sebaliknya komposisi G+C paling banyak pada *C. cryptopterus* (GenBank) yaitu 48,5% dan paling sedikit pada *C. schilbeides* (GenBank) yaitu 41,6%.

Tabel 1. Komposisi nukleotida pada gen sitokrom-b parsial DNA mitokondria *Cryptopterus* spp.

	T(U)	C	A	G	A+T	G+C	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
1	30,4	28,0	24,2	17,4	54,6	45,4	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	22,6	52,8	20,8	3,8
2	30,4	28,0	24,8	16,8	55,2	44,8	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	22,6	52,8	22,6	1,9
3	27,3	31,7	24,2	16,8	51,5	48,5	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	27,8	25,9	17,0	60,4	22,6	0,0
4	26,7	29,8	25,5	18,0	52,2	47,8	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	54,7	24,5	5,7
5	30,4	27,3	26,1	16,1	56,5	43,4	35,2	18,5	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	24,5	49,1	26,4	0,0
6	31,1	24,8	27,3	16,8	58,4	41,6	33,3	18,5	24,1	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	28,3	41,5	28,3	1,9
7	26,7	29,8	26,7	16,8	53,4	46,6	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	54,7	28,3	1,9
8	26,7	29,8	26,7	16,8	53,4	46,6	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	54,7	28,3	1,9
9	27,3	29,2	27,3	16,1	54,6	45,3	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	17,0	52,8	30,2	0,0
10	27,3	29,2	27,3	16,1	54,6	45,3	33,3	20,4	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	17,0	52,8	30,2	0,0
11	28,0	28,0	27,3	16,8	55,3	44,8	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	52,8	30,2	1,9
12	28,0	28,0	27,3	16,8	55,3	44,8	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	52,8	30,2	1,9
13	28,0	28,0	28,0	16,1	56,0	44,1	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	52,8	32,1	0,0
14	28,0	28,0	28,0	16,1	56,0	44,1	37,0	16,7	22,2	24,1	31,5	14,8	29,6	24,1	15,1	52,8	32,1	0,0
R	28,3	28,5	26,5	16,7	54,8	45,2	35,1	18,5	22,4	24,1	31,5	14,8	29,5	24,2	18,2	52,7	27,6	1,5

Keterangan: 1. *C. minor* (GenBank); 2. *C. bicirrhis* (GenBank); 3. *C. cryptopterus* (GenBank); 4. *C. limpok* (GenBank); 5. *C. macrocephalus* (GenBank); 6. *C. schilbeides* (GenBank); 7. LJK2F (*C. limpok* Kampar-primer F); 8. LJK2R (*C. limpok* Kampar-primer R); 9. LJI3F (*C. limpok* Indragiri-primer F); 10. LJI3R (*C. limpok* Indragiri-primer R); 11. LPLK10F (*C. apogon* Kampar-primer F); 12. LPLK10R (*C. apogon* Kampar-primer R); 13. LPLI6F (*C. apogon* Indragiri-primer F); 14. LPLI6R (*C. apogon* Indragiri-primer R); R. rata-rata

Komposisi nukleotida yang mempunyai keragaman terbesar dari keseluruhan triplet kodon gen sitokrom-b parsial ikan lais *Cryptopterus* spp., terletak pada nukleotida ketiga (Tabel 1). Hal ini menurut Randi (1996) dan Butorina *et al.* (2000) merupakan ciri khas gen-gen yang menyandi protein dalam genom DNA mitokondria. Komposisi nukleotida pada kodon kedua adalah yang paling tidak beragam, hal ini dapat dilihat pada komposisi nukleotida pada *C. minor* (GenBank), *C. bicirrhis* (GenBank), *C. limpok* (GenBank), *C. macrocephalus* (GenBank), *C. schilbeides* (GenBank), LJK2F, LJK2R, LJI3F, LJI3R, LPLK10F, LPLK10R, LPLI6F, LPLI6R yaitu sama-sama mempunyai komposisi nukleotida yang terdiri dari T (31,5%), C (14,8%), A (29,6%) dan G (24,1%) (Tabel 1).

Seratus lima puluh sembilan hasil penjabaran berganda gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp. Riau dengan *Cryptopterus* spp. (GenBank), ditranslasikan menjadi 53 asam amino (Lampiran 2 dan Lampiran 3), dengan 39 situs kodon penyandi yang beragam. Posisi 53 asam amino ini terletak pada posisi ke 62 sampai dengan asam amino ke 114, pada acuan asam amino hasil translasi sitokrom b utuh *C. minor* (GenBank) nomor akses AY458895.

Tiga puluh sembilan situs penyandi beragam menyandikan 2 asam amino non sinonimus yaitu pada situs 80 dan 81. Situs asam amino non sinonimus ini merupakan penanda genetik pada *Cryptopterus* spp. *Cryptopterus cryptopterus* (GenBank) mempunyai penanda genetik yaitu Serina (S) pada asam amino ke 80 yang tidak dipunyai *Cryptopterus* lainnya pada situs tersebut. *Cryptopterus macrocephalus* (GenBank) mempunyai penanda genetik Fenilalanina (F) pada asam amino ke 81. *Cryptopterus schilbeides* (GenBank) mempunyai penanda genetik Isoleusina (I) pada asam amino ke 81.

Tiga puluh sembilan situs kodon penyandi yang dikategorikan sebagai situs beragam terjadi karena adanya substitusi transisi dan transversi. Dari 39 situs beragam tersebut kejadian substitusi paling sering terjadi pada basa ketiga dari triplet kodon yaitu sebanyak 34 kali; pada basa kesatu dan ketiga dari triplet kodon sebanyak 4 kali; pada basa kedua dan ketiga dari triplet kodon sebanyak 1 kali (Tabel 2).

Tabel 2. Posisi basa beragam dan jumlah situs kodon penyandi yang mengalami perubahan pada gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp.

Basa beragam pada triplet kodon penyandi	Jumlah situs triplet kodon penyandi
Ke 3	34
Ke 1 dan 3	4
Ke 2 dan 3	1
Total	39 situs

Kejadian substitusi transisi pada nukleotida gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp. disajikan pada Tabel 3. Nilai transisi terbesar adalah 21 nukleotida yaitu antara *C. macrocephalus* (*GenBank*) dengan *C. minor* (*GenBank*). Nilai transisi terkecil terjadi antara *C. apogon* Indragiri (LPLI) dengan *C. apogon* Kampar (LPLK) yaitu 1 nukleotida. Antara *C. limpok* Indragiri (LJI) dengan *C. limpok* Kampar (LJK); dan antara *C. limpok* Kampar (LJK) dengan *C. limpok* (*GenBank*) terjadi transisi sebesar 2 nukleotida. Sedangkan antara *C. limpok* Indragiri (LJI) dengan *C. limpok* (*GenBank*) terjadi transisi sebesar 4 nukleotida.

Tabel 3. Substitusi transisi basa nukleotida ke 1, 2 dan 3 pada gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
[1] <i>C. minor</i> (<i>GenBank</i>)														
[2] <i>C. bicirrhis</i> (<i>GenBank</i>)	3													
[3] <i>C. cryptopterus</i> (<i>GenBank</i>)	17	14												
[4] <i>C. limpok</i> (<i>GenBank</i>)	18	17	12											
[5] <i>C. macrocephalus</i> (<i>GenBank</i>)	21	20	16	12										
[6] <i>C. schilbeides</i> (<i>GenBank</i>)	16	15	18	14	12									
[7] LJK2F	17	16	12	2	12	14								
[8] LJK2R	17	16	12	2	12	14	0							
[9] LJI3F	17	16	12	4	10	12	2	2						
[10] LJI3R	17	16	12	4	10	12	2	2	0					
[11] LPLK10F	14	13	14	8	18	17	6	6	8	8				
[12] LPLK10R	14	13	14	8	18	17	6	6	8	8	0			
[13] LPLI6F	13	12	13	9	17	16	7	7	7	7	1	1		
[14] LPLI6R	13	12	13	9	17	16	7	7	7	7	1	1	0	

Keterangan : Rata-rata transisi = 11 nukleotida

Kejadian substitusi transversi pada nukleotida gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp. disajikan pada Tabel 4. Nilai tranversi terbesar adalah 12 nukleotida yaitu antara *C. schilbeides* (*GenBank*) dengan *C. minor* (*GenBank*); dan antara *C. schilbeides* (*GenBank*) dengan *C. bicirrhis* (*GenBank*). Nilai tranversi terkecil adalah 0 (tidak terjadi substitusi transversi nukleotida) yaitu

antara *C. limpok* Kampar (LJK) dengan *C. limpok* (GenBank); dan antara *C. limpok* Indragiri (LJI) dengan *C. limpok* (GenBank).

Tabel 4. Substitusi tranversi basa ke 1, 2 dan 3 pada gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
[1] <i>C. minor</i> (GenBank)														
[2] <i>C. bicirrhis</i> (GenBank)	0													
[3] <i>C. cryptopterus</i> (GenBank)	9	9												
[4] <i>C. limpok</i> (GenBank)	9	9	4											
[5] <i>C. macrocephalus</i> (GenBank)	7	7	8	10										
[6] <i>C. schilbeides</i> (GenBank)	12	12	5	5	11									
[7] LJK2F	9	9	4	0	10	5								
[8] LJK2R	9	9	4	0	10	5	0							
[9] LJI3F	9	9	4	0	10	5	0	0						
[10] LJI3R	9	9	4	0	10	5	0	0	0					
[11] LPLK10F	8	8	5	1	9	6	1	1	1	1				
[12] LPLK10R	8	8	5	1	9	6	1	1	1	1	0			
[13] LPLI6F	8	8	5	1	9	6	1	1	1	1	0	0		
[14] LPLI6R	8	8	5	1	9	6	1	1	1	1	0	0	0	

Keterangan : Rata-rata transversi = 5 nukleotida

Kejadian substitusi transisi lebih banyak terjadi (rata-rata 11 nukleotida) daripada substitusi tranversi (rata-rata 5 nukleotida) pada gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp. Hal ini sesuai dengan pendapat Kocher *et al.* (1989) yang menyatakan bahwa substitusi nukleotida pada tingkat spesies sebagian besar adalah transisi. Pada gen penyandi protein, substitusi transisi nukleotida adalah perubahan antara basa purin (A dengan G) atau antara basa pirimidin (C dengan T), sedangkan transversi adalah perubahan dari basa purin menjadi basa pirimidin atau sebaliknya. Kejadian transisi dan transversi dapat menyebabkan perubahan atau tidak dapat menyebabkan perubahan asam amino yang ditranslasikan.

Tabel 5. Rasio antara asam amino total, asam amino kekal, asam amino sinonimus dan asam amino non sinonimus pada *Cryptopterus* spp. berdasarkan acuan asam amino hasil translasi gen sitokrom-b *C. minor* (GenBank)

ASAM AMINO	RASIO
Kekal / Total	14 / 53 = 0,26
Sinonimus / Total	37 / 53 = 0,70
Non sinonimus / Total	2 / 53 = 0,04

Lima puluh tiga asam amino hasil translasi 159 nukleotida (53 situs triplet penyandi) terdiri dari 14 asam amino kekal (nukleotidanya tidak mengalami perubahan), 37 asam amino bersifat sinonimus (nukleotida mengalami perubahan tetapi asam aminonya tetap), dan 2 asam amino bersifat non sinonimus (nukleotida berubah dan asam aminonya berubah). Perubahan asam amino yang terjadi sebagian besar adalah bersifat asam amino sinonimus. Rasio antara asam amino kekal, asam amino non sinonimus dan asam amino sinonimus disajikan pada Tabel 5.

Jarak genetik dan hubungan kekerabatan *Cryptopterus* spp. berdasarkan runutan nukleotida

Jarak genetik berdasarkan runutan nukleotida gen sitokrom-b parsial (159 nt) *Cryptopterus* spp. disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Jarak genetik (*p-distance*) berdasarkan nukleotida gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp.

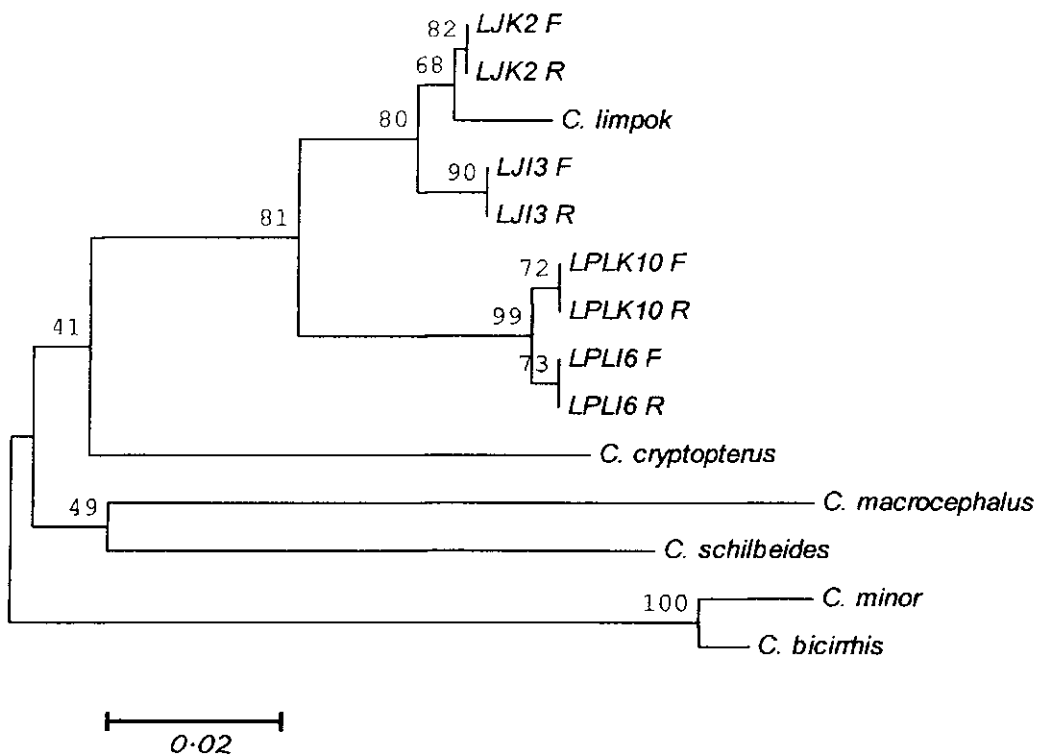
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
[1]														
[2]	0.02													
[3]	0.16	0.14												
[4]	0.17	0.16	0.10											
[5]	0.17	0.17	0.15	0.14										
[6]	0.17	0.17	0.14	0.12	0.14									
[7]	0.16	0.16	0.10	0.01	0.14	0.12								
[8]	0.16	0.16	0.10	0.01	0.14	0.12	0.00							
[9]	0.16	0.16	0.10	0.02	0.12	0.11	0.01	0.01						
[10]	0.16	0.16	0.10	0.02	0.12	0.11	0.01	0.01	0.00					
[11]	0.14	0.13	0.12	0.06	0.17	0.14	0.04	0.04	0.06	0.06				
[12]	0.14	0.13	0.12	0.06	0.17	0.14	0.04	0.04	0.06	0.06	0.00			
[13]	0.13	0.12	0.11	0.06	0.16	0.14	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01		
[14]	0.13	0.12	0.11	0.06	0.16	0.14	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.00	

Keterangan: 1. *C. minor* (GenBank); 2. *C. bicirrhhis* (GenBank); 3. *C. cryptopterus* (GenBank); 4. *C. limpok* (GenBank); 5. *C. macrocephalus* (GenBank); 6. *C. schilbeides* (GenBank); 7. LJK2F (*C. limpok* Kampar-primer F); 8. LJK2R (*C. limpok* Kampar-primer R); 9. LJ13F (*C. limpok* Indragiri-primer F); 10. LJ13R (*C. limpok* Indragiri-primer R); 11. LPLK10F (*C. apogon* Kampar-primer F); 12. LPLK10R (*C. apogon* Kampar-primer R); 13. LPLI6F (*C. apogon* Indragiri-primer F); 14. LPLI6R (*C. apogon* Indragiri-primer R); R. rata-rata = 0,10

Jarak genetik yang mempunyai nilai paling besar (17%) yaitu antara *C. limpok* (GenBank) dengan *C. minor* (GenBank); antara *C. macrocephalus* (GenBank) dengan *C. minor* (GenBank); antara *C. macrocephalus* (GenBank) dengan *C. bicirrhhis* (GenBank); antara *C. schilbeides* (GenBank) dengan *C. minor*

(GenBank); antara *C. schilbeides* (GenBank) dengan *C. bicirrhis* (GenBank). Jarak genetik antara *C. limpok* Kampar (LJK) dengan *C. limpok* (GenBank); antara *C. limpok* Indragiri (LJI) dengan *C. limpok* Kampar (LJK); antara *C. apogon* Indragiri (LPLI) dengan *C. apogon* Kampar (LPLK) mempunyai nilai yang kecil yaitu 1%. Jarak genetik antara *C. limpok* Indragiri (LJI) dengan *C. limpok* (GenBank) mempunyai nilai 2 %.

Hubungan kekerabatan dilakukan antara ikan Lais *C. limpok* Kampar, *C. limpok* Indragiri, *C. apogon* Kampar dan *C. apogon* Indragiri, dengan pembandingan *Cryptopterus* (GenBank), berdasarkan runutan 159 nukleotida gen sitokrom-b parsial (Gambar 3).



Gambar 3. Filogram menggunakan metode *Neighbor Joining* berdasarkan nukleotida gen sitokrom-b parsial *Cryptopterus* spp.

Hasil filogram berdasarkan nukleotida gen sitokrom b parsial memperlihatkan bahwa ikan lais *C. limpok* Kampar (LJK), *C. limpok* Indragiri (LJI), *C. limpok* (GenBank) membentuk kelompok hubungan kekerabatan yang didukung dengan nilai *bootstrap* 80% (Gambar 3). *Cryptopterus apogon* Kampar dengan *C. apogon* Indragiri membentuk kelompok hubungan kekerabatan dengan