

# Kajian Penanda Genetik Gen Sitokrom b DNA Mitokondria Ikan Lais dari Sungai Kampar Riau

Roza Elvyra<sup>1)</sup> dan Dedy Duryadi Solihin<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Riau, 28293  
e-mail: roza\_elvyra@yahoo.com

<sup>2)</sup>Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, 16680  
e-mail: dduryadi@yahoo.com

Diterima 10-08-2007

Disetujui 20-10-2007

## ABSTRACT

The mitochondrial cytochrome b (cyt-b) gene as a phylogenetic marker of lais fish *Kryptopterus schilbeides* from Kampar River in Riau has been studied. This is a preliminary research on the utility of cyt-b gene as a molecular marker to obtain species diversity and phylogenetic relationship among *Kryptopterus* fishes from Kampar River. The primers of L14841 and H15149 were used to amplify the cyt-b gene. The results showed that *K. schilbeides* has isoleucine at site-81 and metionine at site-114; *K. schilbeides* from Kampar River and *K. schilbeides* from GenBank form a phylogeny cluster at 45% value.

**Keywords:** cytochrome b, Kampar River, mitochondrial DNA, *Kryptopterus schilbeides*

## PENDAHULUAN

Ikan lais *Kryptopterus* spp. termasuk kelas Osteichthyes, ordo Siluriformes dan famili Siluridae (Nelson 1984; Kottelat *et al*, 1993). Daerah penyebaran ikan lais, salah satunya adalah di Sungai Kampar Riau. Ikan lais dikonsumsi oleh masyarakat Riau dan dapat dibeli dalam keadaan segar maupun dalam bentuk salai. Ikan ini dalam bentuk salai merupakan makanan yang khas di propinsi Riau, dan sering dijadikan oleh-oleh untuk tamu yang berkunjung. Ikan lais merupakan salah satu potensi sumberdaya hayati perairan tawar di Riau. Ada 14 jenis ikan lais dalam genus *Kryptopterus*, termasuk salah satunya *K. schilbeides* (Kottelat *et al*, 1993). Penelitian secara molekuler yang sekarang ini sudah berkembang pesat perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman jenis dan hubungan kekerabatan ikan lais.

DNA mitokondria banyak digunakan untuk penelitian keragaman jenis dan hubungan kekerabatan secara molekuler, karena mempunyai beberapa kelebihan. Pertama, DNA mitokondria memiliki ukuran yang kompak dan relatif kecil (16.000-20.000 pasang basa), tidak sekompleks DNA inti, sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh. Kedua, DNA mitokondria berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti. Ketiga, hanya sel telur yang menyumbangkan material mitokondria sehingga hanya diturunkan dari induk betina. Keempat, bagian-bagian dari genom DNA

mitokondria berevolusi dengan laju yang berbeda (Iguchi *et al*, 1999).

Berdasarkan *GenBank*, (2006), data genom dari DNA mitokondria *Kryptopterus* belum ditemukan. Data genom DNA mitokondria ikan *Ictalurus punctatus*, *Pseudobagrus tokiensis* dan *Pangasianodon gigas* yang termasuk satu ordo dengan *Kryptopterus* telah dilaporkan. Walaupun demikian, data gen sitokrom b yang merupakan bagian genom DNA mitokondria pada *Kryptopterus minor* sudah dilaporkan secara lengkap (Wilcox *et al*, 2004). Gen sitokrom b dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk mempelajari keragaman jenis dan hubungan kekerabatan, karena kodonnya berdasarkan posisi, mempunyai region yang lebih kekal (*conserve*) dan region yang lebih beragam (Farias *et al*, 2001). Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk mengungkapkan keragaman jenis dan hubungan kekerabatan ikan lais, terutama terhadap *K. schilbeides* dari S. Kampar Riau berdasarkan penanda genetik gen sitokrom b, yang sampai saat ini belum diketahui.

## BAHAN DAN METODE

Ikan lais diperoleh dari hasil penangkapan ikan oleh nelayan dari S. Kampar Riau. Identifikasi jenis ikan secara morfologi dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi Kottelat *et al*, (1993). Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Studi Ilmu

Hayati-Pusat Antar Universitas (PSIH-PAU), Institut Pertanian Bogor.

**Isolasi dan Purifikasi DNA total.** Otot ikan lais *K. schilbeides* diambil dalam bentuk potongan kecil dan dicacah halus. Sampel otot tersebut dimasukkan ke dalam tabung ependorf, kemudian ditambahkan dengan larutan *digestion buffer* {1% (W/V) SDS; 0,5 M Tris-HCl, pH 9,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl; 20 mg/ml Proteinase K} sebanyak 500 µl, selanjutnya sampel dihancurkan sampai halus dengan pengaduk gelas di dalam tabung ependorf. Setelah sampel cukup halus, ditambahkan lagi larutan *digestion buffer* 250 µl, digoyang sebentar dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 55°C selama semalam. Sampel yang sudah diinkubasi ditambahkan dengan fenol sebanyak 500 µl, digoyang sampai tercampur rata, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke ependorf baru, kemudian ditambahkan kloroform iso amil alkohol sebanyak 500 µl, digoyang sampai tercampur rata dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke ependorf baru dan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2 kali volume sampel, digoyang sebentar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya etanol absolut dalam ependorf tersebut dibuang, endapan yang tinggal dalam ependorf ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 500 µl, digoyang sebentar dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit, kemudian DNA yang diperoleh dikeringkan di udara terbuka. Setelah itu DNA ditambahkan dengan larutan TE {10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0} sebanyak 100 µl, digoyang sebentar, selanjutnya diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 15 menit. Sampel DNA disimpan dalam freezer (Duryadi 1993).

**Elektroforesis hasil purifikasi.** Hasil purifikasi dimigrasikan pada gel agarose 1,2% dengan menggunakan piranti *sub marine* elektroforesis (Hoefler, USA). DNA total divisualisasikan dengan bantuan UV transluminator (λ = 300 nm), menggunakan gel yang diwarnai dengan ethidium bromide (0,5 µg/ml).

**Amplifikasi Gen sitokrom b DNA mitokondria dengan teknik PCR.** DNA total hasil purifikasi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen sitokrom b DNA mitokondria ikan

lais adalah primer *forward* L14841 (5'AAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3') dan primer *reverse* H15149 (5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA3'). Pasangan primer ini merupakan primer universal yang didesain berdasarkan region runutan sitokrom b DNA mitokondria yang kekal (*conserve*) dari berbagai publikasi (Kocher *et al*, 1989). Amplifikasi DNA menggunakan mesin *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 2400* (Perkin Elmer). Strategi amplifikasi dan komposisi campuran larutan menggunakan metode Duryadi, (1993). Kondisi *PCR* yang digunakan adalah: *pra PCR* dengan suhu 94°C selama 5 menit, *PCR*: denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, penempelan dengan suhu 55°C selama 45 detik, pemanjangan dengan suhu 72°C selama 1 menit (sebanyak 35 siklus) dan *post PCR* dengan suhu 72°C selama 5 menit.

**Elektroforesis hasil amplifikasi.** Hasil amplifikasi dimigrasikan pada gel agarose 1,2% dengan menggunakan piranti *submarine* elektroforesis (Hoefler, USA). Hasil *PCR* ini divisualisasi dengan bantuan UV transluminator (λ = 300 nm) menggunakan gel yang diwarnai dengan ethidium bromide (0,5 µg/ml).

**Perunutan DNA.** DNA produk *PCR* dipurifikasi dengan kit purifikasi, kemudian digunakan sebagai cetakan untuk perunutan. Amplifikasi untuk perunutan dengan kondisi *PCR* yaitu: *pra PCR* dengan suhu 94°C selama 5 menit, *PCR*: denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, penempelan dengan suhu 55°C selama 45 detik, pemanjangan dengan suhu 60°C selama 1 menit (sebanyak 35 siklus) dan *post PCR* dengan suhu 60°C selama 5 menit. Perunutan DNA dilakukan di PT. Charoen Pokphand Indonesia, dengan menggunakan mesin perunut DNA otomatis *ABI Prism* versi 3,7 (USA).

**Analisis data.** Runutan basa nukleotida gen sitokrom b DNA mitokondria yang diperoleh kemudian disejajarkan dengan data runutan gen sitokrom lengkap *K. minor* (*GenBank* 2006; AY458895). Selain itu, data runutan gen sitokrom b parsial juga digunakan yaitu *K. schilbeides* (DQ119482), *K. cryptopterus* (DQ119434), *K. limpok* (DQ119431) dan *K. macrocephalus* (DQ119483). Analisis data menggunakan program *MEGA* versi 3,0 (Kumar *et al*, 2004) dengan metode *Bootstrap Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan purifikasi DNA total dari cuplikan otot ikan lais *K. schilbeides* yang berasal dari S. Kampar Riau, digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen sitokrom b DNA mitokondria. Berdasarkan runutan gen sitokrom b lengkap *K. minor* berukuran 1141 pb (*GenBank* 2006 nomor akses AY458895; Wilcox *et al*, 2004) yang digunakan sebagai pembanding, fragmen yang dihasilkan dari amplifikasi berukuran 373 pb (Gambar 1), yaitu terletak pada basa ke 61 sampai dengan basa ke 433. Fragmen ini lebih panjang jika dibandingkan dengan Kocher *et al*, (1989) yang mendapatkan ukuran fragmen gen sitokrom b yang juga diamplifikasi dengan primer L14841 dan H15149 pada berbagai vertebrata yaitu sepanjang 307 pb.

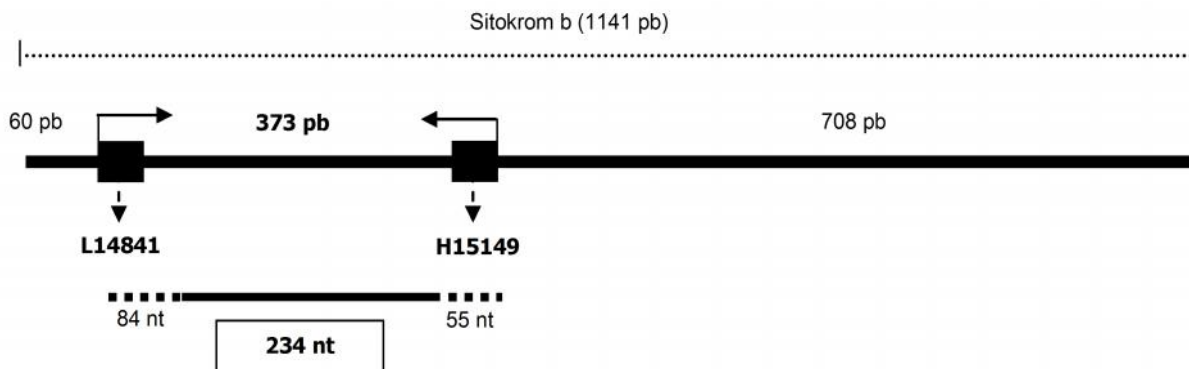
Fragmen gen sitokrom b *K. schilbeides* yang diperoleh dari amplifikasi, dilakukan perunutannya dengan menggunakan primer H15149. Penjajaran berganda dilakukan terhadap runutan yang diperoleh dengan menggunakan program MEGA versi 3,0 (Kumar *et al*, 2004). Pembanding yang digunakan adalah runutan-runutan gen sitokrom b *Kryptopterus* spp. dari *GenBank* baik yang lengkap maupun parsial. Runutan yang diperoleh dari hasil penjajaran berganda adalah 234 nukleotida (Gambar 1). Runutan ini terletak pada posisi ke 145 sampai dengan posisi ke 378 apabila dibandingkan kepada gen sitokrom b lengkap *K. minor* (*GenBank* 2006; Wilcox *et al*, 2004). Bagian runutan fragmen yang tidak terbaca yaitu 84 nukleotida dari ujung 5' primer L14841 dan 55 nukleotida dari ujung 5' primer H15149.

Komposisi nukleotida gen sitokrom b parsial *K. schilbeides* dari S. Kampar Riau (dibandingkan dengan data *Kryptopterus* spp. dari *GenBank*) disajikan pada Tabel 1. Rata-rata nukleotida C adalah yang paling

banyak ditemukan (29,2%), diikuti oleh nukleotida T (28,4%), A (26,9%), sedangkan yang paling sedikit ditemukan adalah G (15,5%). Rata-rata frekwensi komposisi nukleotida A+T pada *Kryptopterus* spp. adalah lebih besar (55,4%) dibandingkan G+C (44,6%). Komposisi nukleotida yang paling tidak beragam dari keseluruhan triplet kodon terletak pada nukleotida ke 2. Hal ini dapat dilihat pada nukleotida *K. minor* (*GenBank*), *K. schilbeides* (*GenBank*), *K. schilbeides* (S. Kampar), *K. limpok* (*GenBank*) dan *K. macrocephalus* (*GenBank*) yaitu sama-sama mempunyai komposisi yang terdiri dari T (38,5%), C (20,5%), A (24,4%) dan G (16,7%). Keragaman terbesar terletak pada nukleotida ke 3.

Dua ratus tiga puluh empat nukleotida hasil penjajaran berganda dengan menggunakan program MEGA versi 3,0 (Kumar *et al*, 2004) ditranslasikan menjadi 78 asam amino dengan 56 situs penyandi yang beragam. Lima puluh enam situs penyandi beragam tersebut menyandikan 53 asam amino sinonimous (nukleotida berubah, tetapi asam amino tidak berubah) dan 3 asam amino non sinonimous (nukleotida dan asam amino berubah). Asam amino non sinonimous ini terletak pada situs ke 80, 81 dan 114 yang merupakan penanda genetik pada *Kryptopterus* spp. (Tabel 2). Ikan lais *K. schilbeides* (S. Kampar) mempunyai penanda genetik isoleusina pada situs ke 81 dan metionina pada situs ke 114.

Lima puluh enam situs penyandi yang dikategorikan sebagai penyandi beragam terjadi karena adanya substitusi transisi dan transversasi nukleotida pada triplet kodon. Nilai substitusi transisi dan transversasi nukleotida disajikan pada Tabel 3 dan Tabel 4. Nilai substitusi transisi terbesar terjadi antara *K. macrocephalus* (*GenBank*) dengan *K. minor* (*GenBank*)



Gambar 1. Skema posisi primer L14841 dan H15149, fragmen gen sitokrom b *Kryptopterus schilbeides* (373 pb) dan runutan hasil penjajaran berganda (234 nt); dengan pembanding sitokrom b lengkap *Kryptopterus minor* data *GenBank* (1141 pb)



Lanjutan Tabel 2

Situs kodon ke-	54 (102)	55 (103)	56 (104)	57 (105)	58 (106)	59 (107)	60 (108)	62 (110)	63 (111)	65 (113)	<b>66</b> <b>(114)</b>	67 (115)
<i>K. minor</i> (GenBank)	TAC	TAT	GGC	TCC	TAC	TTA	TAT	GAA	ACC	AAT	ATT	GGG
<i>K. schilbeides</i> (GenBank)	...	..C	..A	..A	..T	C..	...	...	..A	...	...	..T
<i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	...	..C	...	..A	...	C..	..C	...	...	..C	<b>..G</b>	..A
<i>K. cryptopterus</i> (GenBank)	...	..C	..T	...	...	C..T	..C	...	...	..C	..C	..A
<i>K. limpok</i> (GenBank)	..T	..C	...	..A	..T	C..	..C	..G	...	..C	...	..A
<i>K. macrocephalus</i> (GenBank)	...	..C	...	..A	..T	C..T	..C	...	...	..C	...	..C
Situs Asam Amino ke-	54 (102)	55 (103)	56 (104)	57 (105)	58 (106)	59 (107)	60 (108)	62 (110)	63 (111)	65 (113)	<b>66</b> <b>(114)</b>	67 (115)
<i>K. minor</i> (GenBank)	Y	Y	G	S	Y	L	Y	E	T	N	I	G
<i>K. schilbeides</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>M</b>	.
<i>K. cryptopterus</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>K. limpok</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>K. macrocephalus</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Situs kodon ke-	68 (116)	69 (117)	71 (119)	72 (120)	73 (121)	75 (123)	77 (125)	78 (126)				
<i>K. minor</i> (GenBank)	GTA	GTC	CTA	CTC	CTA	ATG	ACA	GCC				
<i>K. schilbeides</i> (GenBank)	...	..T	T..	..T	T..	...	..C	...				
<i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	...	...	...	..A	...	..A	..C	..A				
<i>K. cryptopterus</i> (GenBank)	..G	..A	...	..T	T..	...	..T	...				
<i>K. limpok</i> (GenBank)	..C	..A	...	..T	...	..A	..T	...				
<i>K. macrocephalus</i> (GenBank)	...	...	T..	...	T..	..A	..T	...				
Situs Asam Amino ke-	68 (116)	69 (117)	71 (119)	72 (120)	73 (121)	75 (123)	77 (125)	78 (126)				
<i>K. minor</i> (GenBank)	V	V	L	L	L	M	T	A				
<i>K. schilbeides</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.				
<i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	.	.	.	.	.	.	.	.				
<i>K. cryptopterus</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.				
<i>K. limpok</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.				
<i>K. macrocephalus</i> (GenBank)	.	.	.	.	.	.	.	.				

Keterangan: Angka dalam tanda kurung () = urutan situs berdasarkan runutan sitokrom b utuh *K. minor* (GenBank); tanda titik = runutan yang sama dengan *K. minor* (GenBank); huruf tebal bergaris bawah = perubahan non sinonimous (nukleotida berubah dan asam amino berubah); angka tebal = situs asam amino non sinonimous.

yaitu 0,12. Sedangkan nilai substitusi transversal terbesar terjadi antara *K. schilbeides* (GenBank) dengan *K. minor* (GenBank), dan antara *K. macrocephalus* (GenBank) dengan *K. limpok* (GenBank), yaitu 0,06. Nilai substitusi nukleotida terkecil terjadi antara *K. limpok* (GenBank) dengan *K. cryptopterus* (GenBank) yaitu nilai transisi 0,06 dan transversal 0,03. Substitusi nukleotida antara *K. schilbeides* (S. Kampar) dengan *K. schilbeides* (GenBank) mempunyai nilai yang kecil yaitu nilai transisi 0,07 dan transversal 0,04. Tabel 3 dan Tabel 4 juga memperlihatkan bahwa substitusi transisi nukleotida lebih banyak terjadi daripada transversal pada gen sitokrom b parsial *Kryptopterus* spp. Hal ini sesuai dengan pendapat Kocher *et al*, (1989), yang menyatakan bahwa sebagian besar substitusi nukleotida pada tingkat spesies adalah transisi. Pada gen penyandi protein, substitusi transisi adalah perubahan antara basa purin (A dengan G) atau antara basa pirimidin (C dengan T), sedangkan transversal

adalah perubahan dari basa purin menjadi basa pirimidin atau sebaliknya.

Perbedaan nukleotida pada gen sitokrom b parsial *Kryptopterus* spp. disajikan pada Tabel 5. Nilai perbedaan paling besar adalah antara *K. schilbeides* (GenBank) dengan *K. minor* (GenBank), dan antara *K. cryptopterus* (GenBank) dengan *K. minor* (GenBank), yaitu 38 nukleotida. Nilai perbedaan terkecil terjadi antara *K. limpok* (GenBank) dengan *K. cryptopterus* (GenBank) yaitu 21 nukleotida. Perbedaan nukleotida antara *K. schilbeides* (S. Kampar) dengan *K. schilbeides* (GenBank) mempunyai nilai yang kecil yaitu 26 nukleotida. Nilai perbedaan nukleotida berkaitan dengan hubungan kekerabatan antara ikan lais *Kryptopterus* spp.

Hubungan kekerabatan berdasarkan runutan nukleotida memperlihatkan bahwa antara *K. schilbeides* (S. Kampar) dengan *K. schilbeides* (GenBank) membentuk satu kelompok dengan nilai 45% (Gambar

Tabel 3. Nilai substitusi transisi berdasarkan runutan nukleotida gen sitokrom b parsial *Kryptopterus schilbeides* dengan pembandingan data *GenBank*

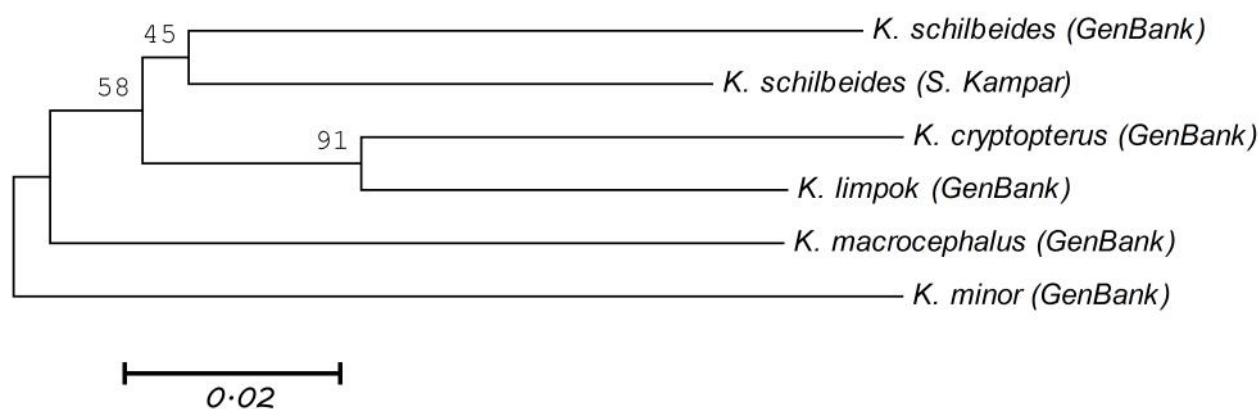
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
[1] <i>K. minor</i> ( <i>GenBank</i> )						
[2] <i>K. schilbeides</i> ( <i>GenBank</i> )	0,10					
[3] <i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	0,10	0,07				
[4] <i>K. cryptopterus</i> ( <i>GenBank</i> )	0,11	0,10	0,07			
[5] <i>K. limpok</i> ( <i>GenBank</i> )	0,11	0,09	0,06	0,06		
[6] <i>K. macrocephalus</i> ( <i>GenBank</i> )	0,12	0,09	0,09	0,10	0,08	

Tabel 4. Nilai substitusi transversi berdasarkan runutan nukleotida gen sitokrom b parsial *Kryptopterus schilbeides* dengan pembandingan data *GenBank*

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
[1] <i>K. minor</i> ( <i>GenBank</i> )						
[2] <i>K. schilbeides</i> ( <i>GenBank</i> )	0,06					
[3] <i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	0,04	0,04				
[4] <i>K. cryptopterus</i> ( <i>GenBank</i> )	0,05	0,03	0,05			
[5] <i>K. limpok</i> ( <i>GenBank</i> )	0,05	0,03	0,05	0,03		
[6] <i>K. macrocephalus</i> ( <i>GenBank</i> )	0,04	0,05	0,04	0,05	0,06	

Tabel 5. Perbedaan jumlah nukleotida berdasarkan runutan nukleotida gen sitokrom b parsial *Kryptopterus schilbeides* dengan pembandingan data *GenBank*

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
[1] <i>K. minor</i> ( <i>GenBank</i> )						
[2] <i>K. schilbeides</i> ( <i>GenBank</i> )	38					
[3] <i>K. schilbeides</i> (S. Kampar)	34	26				
[4] <i>K. cryptopterus</i> ( <i>GenBank</i> )	38	32	29			
[5] <i>K. limpok</i> ( <i>GenBank</i> )	37	30	26	21		
[6] <i>K. macrocephalus</i> ( <i>GenBank</i> )	36	33	31	35	31	

Gambar 2. Filogram menggunakan metode *Bootstrap Neighbor-Joining* berdasarkan runutan nukleotida gen sitokrom b parsial *Kryptopterus schilbeides* dengan pembandingan data *GenBank*

2). Sedangkan hubungan kekerabatan antara *K. schilbeides* (*GenBank*) dengan *K. minor* (*GenBank*), dan antara *K. cryptopterus* (*GenBank*) dengan *K. minor* (*GenBank*) yang mempunyai perbedaan nukleotida terbesar menunjukkan hubungan kekerabatan yang jauh. Perbedaan nukleotida terkecil antara *K. limpok* (*GenBank*) dengan *K. cryptopterus* (*GenBank*) menunjukkan hubungan kekerabatan terdekat dengan nilai 91%.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ikan lais *K. schilbeides* dari S. Kampar Riau mempunyai penanda genetik isoleusina pada situs ke 81 dan metionina pada situs ke 114 dan membentuk kelompok hubungan kekerabatan dengan *K. schilbeides* dari data *GenBank* dengan nilai 45%.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek TPSPD-UNRI (ADB Loan No. 1792-INO) untuk program Doktor, kontrak No. 10/TPSPD-UNRI/C-SD/2004. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Kepala Pusat Studi Ilmu Hayati-Pusat Antar Universitas (PSIH-PAU), Institut Pertanian Bogor, atas fasilitas laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Duryadi, D.** 1993. Role possible du comportement dan's i'evolution de Deux Souris *Mus macedonicus* et *Mus spicilegus* en Europe Centrale. *Thesis Doctorat*. France: Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
- Farias, I.P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H. & Meyer, A.** 2001. The Cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among Cichlid fishes. *J. Mol. Evol.* **53**: 89-103.
- GenBank.** 2006. Genomes. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (14 Maret 2006).
- Iguchi, K., Tanimura, Y., Takeshima, H. & Nishida, M.** 1999. Genetic variation and geographic population structure of amphidromous Ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Fish. Sci.* **65**: 63-67.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C.** 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6196-6200.
- Kottelat, M., Whitten, A.J., Kartikasari, S.N. & Wirdjoatmodjo, S.** 1993. *Freshwater fishes of western Indonesia and Sulawesi*. Jakarta: Periplus edition (HK) in collaboration with the environment Rep. of Indonesia.
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M.** 2004. MEGA 3.0: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence allignment. *Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Nelson, J.S.** 1984. *Fishes of the world*. Canada: John Willey & Sons.
- Wilcox, T.P., Garcia de Leon, F.J., Hendrickson, D.A. & Hillis, D.M.** 2004. Convergence among cave catfishes: long-branch attraction and Bayesian relative rates test. *Mol. Phylogenet. Evol.* **31**: 1101-1113.