

KARAKTERISASI GENETIK IKAN KELABAU (*Osteochilus kelabau*) DARI
BERB AGAILOKASIDI KALIMANTAN BARAT MENGGUNAKAN
METODE RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)¹
[Genetic Characterization of Kelabau Fish (*Osteochilus kelabau*) from Several Locations
in West Kalimantan Using RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) Method]

Irin Iriana KusminiEs*, Rudy Gustiano dan Mulyasari

Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar

Jin Sempur No. 1,16154

* e-mail: iriniriana@gmail.com

ABSTRACT

Kelabau fish (*Osteochilus* sp.) is an endemic fish to Kalimantan inland waters that is potential to be developed. The aim of this research was to characterize Kelabau fish and to study the data base (genetic character) of kelabau as well as its relationship. The result showed that the highest polymorphism and heterozigosity was on Kelabau Sintang and the lowest was on Kelabau Kapuas Hulu. The closest genetic distance value were between Kelabau Pontianak-Kapuas Hulu (0.5351) and the furthest were between Kelabau Pontianak-Sintang (0.6852).

Key words: characterization, genetic, RAPD, kelabau fish.

ABSTRAK

Ikan kelabau (*Osteochilus* sp.) adalah ikan endemik asal perairan umum Kalimantan yang potensial untuk dikembangkan. Tujuan penelitian ini adalah karakterisasi dan studi data base (karakter genetik) ikan kelabau dan hubungan kekerabatannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai heterozigositas dan polimorfisme tertinggi adalah ikan Kelabau asal Sintang sedangkan yang terendah adalah ikan Kelabau asal Kapuas Hulu. Jarak genetik terdekat dari ikan kelabau adalah antara Kelabau Pontianak dengan Kapuas Hulu (0,5351) dan terjauh adalah antara Kelabau Pontianak dengan Sintang (0,6852).

Kata kunci: karakterisasi, genetik, RAPD, Ikan Kelabau.

PENDAHULUAN

Propinsi Kalimantan Barat dengan luas wilayah daratan sekitar 146.087 km² dan memiliki sungai terpanjang di Indonesia yaitu Sungai Kapuas dengan panjang 1.038 km. Potensi sektor perikanan meliputi budidaya ikan air tawar seluas 11.276 ha. Perairan umum di Kalimantan Barat diperkirakan dihuni 300 jenis ikan, di mana sekitar 100 jenis ikan dominan mempunyai nilai ekonomi penting, antara lain Gabus (*Channa* spp.), Sepat (*Trichogaster* spp.), Jelawat (*Leptobarbus hoeveni*), Kelabau (*Osteochilus* spp.), Pipih (*Notopterus* spp.), Patin (*Pangasius* spp.), Betutu (*Oxyleotris marmorata*), Papuyu (*Anabas testudens*), Baung (*Mystus nemurus*) dan Lele (*Clarias* spp.). Jenis-jenis ikan tersebut merupakan penghuni khas perairan rawa yang mempunyai nilai ekonomi penting.

Ikan Kelabau (*Osteochilus* spp.), merupakan jenis ikan asli Kalimantan yang hampir punah. Maraknya praktik penyetruman membuat jenis ikan ini hampir tak pernah lagi ditemukan. Penurunan populasi

ikan akibat praktik penyetruman, untuk jenis Jelawat, Pipih, Andungan, Kelabau, Haruan, Papuyu, Sepat Siam dan Biawan, terus terjadi sejak tahun 1995. Menurut Kristanto *et al.* (2008), ikan Kelabau memiliki ukuran mencapai 1 kg/ekor jika dibandingkan dengan ikan Nilem dari Jawa Barat yang hanya mencapai ukuran 100-200 gram/ekor.

Pola kebijaksanaan pengelolaan perairan umum meliputi beberapa hal, antara lain meningkatkan teknologi budidaya ikan, terutamajenis-jenis ikan yang disukai masyarakat dan mempunyai nilai jual yang tinggi. Selain itu, benih ikan yang dihasilkan diharapkan juga bisa dimanfaatkan untuk restocking guna memacu rekrutmen. Seiring dengan akan dikembangkannya Etalase Perikanan Perairan Umum di Kalimantan, maka pola kebijaksanaan pengelolaan perairan umum ke depan meliputi beberapa hal, antara lain (1) meningkatkan teknologi budidaya ikan, terutamajenis-jenis ikan yang disukai masyarakat dan mempunyai nilai jual yang tinggi; (2) memperhatikan konservasi

sejalan dengan peningkatan produksi melalui program peningkatan stok (stock enhancement), seperti restocking dan penyediaan/pembentukan daerah suaka perikanan (reservaat); (3) mengaktifkan fungsi pengawasan masyarakat dalam rangka menumbuhkan rasa memiliki dan tanggung jawab terhadap kelestarian sumber daya ikan yang didukung dengan penyediaan perangkat hukumnya; dan (4) menata kembali aktivitas manusia yang diperkirakan dapat menimbulkan dampak negatif terhadap kelestarian sumber daya ikan. Oleh karena itu upaya untuk melestarikan sumberdaya hayati perairan umum dan riset mengenai penguasaan domestikasi ikan perairan umum yang mempunyai nilai prospektif tinggi perlu dilakukan.

Dalam pelaksanaan program domestikasi dibutuhkan penyediaan induk yang berkualitas untuk budidaya; ujuannya agar benih yang dihasilkan memiliki kualitas yang unggul dan hal ini berkaitan erat dengan variasi genetik induk ikan Kelabau. Variasi genetik penting keberadaannya dalam populasi dan terus menerus dikelola dan harus diperluas agar selalu tersedia bahan untuk meningkatkan stok yang unggul.

Tujuan dari penelitian adalah mengetahui karakter genetik ikan Kelabau. Manfaat penelitian ini adalah mengetahui data base (karakter genetik) ikan Kelabau dan kekerabatannya. Analisis karakter genetik perlu dilakukan sebagai syarat awal dalam menentukan variasi genetik atau kekerabatan yang dimiliki ikan Kelabau tersebut. Dengan demikian domestikasi dapat dilakukan secara rasional dengan memanfaatkan sumber genetik induk dari satu lokasi atau beberapa lokasi yang berkualitas maupun dari jenis strain yang berbeda untuk memproduksi benih-benih unggul yang berkelanjutan.

Penentuan variasi genetik ini dapat dilakukan secara molekuler dengan berbagai macam metode antara lain adalah *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Kemampuan RAPD dalam mendeteksi polimorfisme cukup tinggi karena primer oligonukleotida bisa mendata genom yang memiliki situs *ik&tan perfect* dan *subperfect* dalam reaksi PCR (Dunham, 2004; Liu, 2007). Saat dua situs ikatan berjarak cukup dekat (3000 bp atau kurang), pita RAPD akan terlihat pada gel. Biasanya setiap primer RAPD mampu mengamplifikasi beberapa pita yang diantaranya

polimorfik bahkan untuk populasi yang sekerabat (Dunham, 2004). Variasi genetik dan perbedaan dalam atau antara taxa biasanya dihitung dari ada tidaknya pita DNA yang muncul yang diatur oleh perubahan sekuens DNA untuk setiap lokus (Liu, 2007).

Menurut Liu (2007), marka RAPD telah digunakan secara luas untuk identifikasi spesies dan strain ikan dan moluska, analisis struktur populasi udang dan alga, analisis dampak genetik dari stressor lingkungan dan analisis diversitas genetik RAPD juga telah digunakan untuk studi *linkage-mapping* pada spesies ikan. *Linkage map* menghasilkan sejumlah marka RAPD untuk determinasi kelamin, dan juga pola warna, ketahanan terhadap penyakit, respon imun serta *trait* kualitatif lain, disamping *trait* kuantitatif yang dapat digunakan untuk *linkage selection* (Jayasankar, 2005). Teknik RAPD telah digunakan dalam penelitian ikan *Barbus* sp. asal Spanyol (Callejas & Ochoa, 2003), ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Bartfai *et al.*, 2001), alga merah (*Gelidium sesquipedale*) (Alberto *et al.*, 1999), rumput laut *Kappaphycus alvarezii* (Parenrengi *et al.*, 2006) dan ikan batak (*Tor soro*) (Asih *et al.*, 2008).

Menurut Beaumont dan Hoare (2003), teknik RAPD merupakan teknik analisis DNA yang cepat dan murah dalam mendapatkan data molekuler genetik. Hal serupa juga dinyatakan oleh Dunham (2004), bahwa RAPD memiliki kriteria sebagai sistem marka yang ideal karena polimorfiknya yang tinggi, mudah dan cepat, serta ekonomis. Di samping itu RAPD tidak membutuhkan *probe* atau informasi sekuens seperti untuk analisis RFLP dan DNA satelit. Sedangkan menurut Liu (2005), RAPD memiliki semua keunggulan sebagai marka hasil PCR, primer yang digunakan tersedia secara komersial dan teknik ini tidak membutuhkan pengetahuan mengenai target sekuens DNA atau organisasi gennya.

BAHANDAN METODE

Ikan Kelabau ukuran 10-20 cm/ekor disampling dari lokasi perairan Pontianak, Kapuas Hulu dan Sintang (Kalimantan Barat) masing-masing sebanyak 20 ekor. Identifikasi karakter genetik melalui analisis kimiawi menggunakan analisis DNA sampel ikan. Sampel ikan hidup dipotong bagian siripnya yang

kemudian disimpan dalam larutan alkohol 70% sampai akan digunakan.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA ikan menggunakan metode *Phenol-Chloroform*. Sirip ikan dengan berat 5-10 mg, dimasukkan dalam tabung 1,5 ml telah berisi 500 μ l larutan TNES urea ditambahkan Protein Kinase 15 μ g/ml, diinkubasi pada suhu 55°C (1 jam). Setelah didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan larutan *Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol* sebanyak 1000 μ l. Selanjutnya disentrifuse kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Lapisan supernatan dimasukkan dalam tabung baru ditambahkan 1000 μ l larutan ethanol 90% dan 10 μ l larutan natrium asetat divortex sampai mengendap. Diperoleh pelet DNA, selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar. Pelet DNA dilarutkan dalam 50-100 μ l Tris-EDTA (TE) buffer, disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

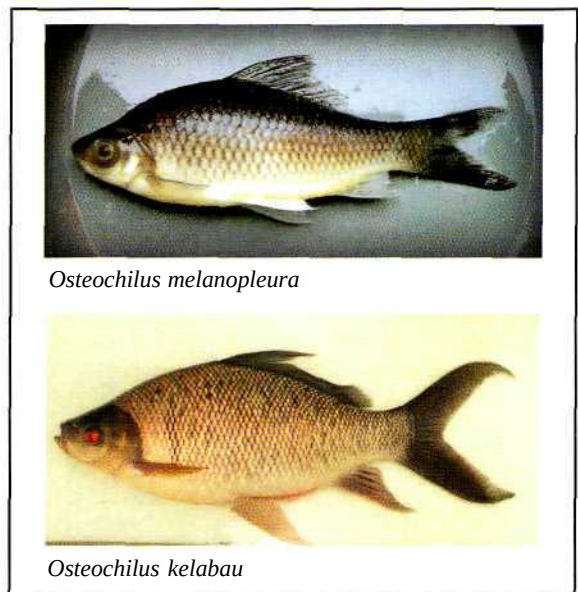
RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA dengan menggunakan metode RAPD adalah OPA-13. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan uji *Polymerize Chain Reaction* (PCR) dengan komposisi bahan sebagai berikut: 2 μ l DNA genom hasil ekstraksi, 2 μ l primer, "*Pure taq Promega*" (komposisi: PCR buffer, enzim *Taq polymerase*, $MgCl_2$ dan dNTP mix) dan *distilled water* sehingga total volume menjadi 25 μ l. Siklus PCR yang digunakan dalam amplifikasi adalah satu siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, 35 siklus penggandaan yang terdiri dari 94°C selama 1 menit, 36°C selama 1 menit dan 72°C selama 2,5 menit. Selanjutnya satu siklus terakhir pada suhu 72°C selama

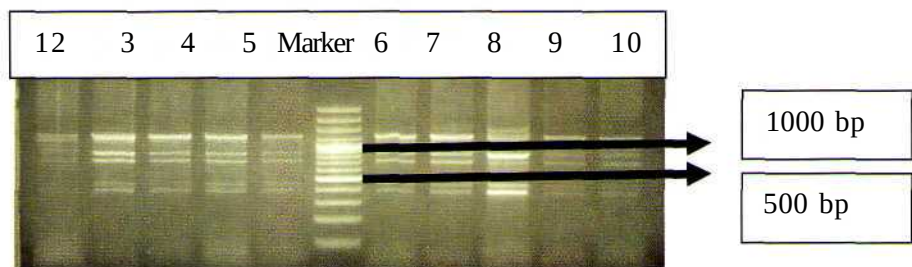
10 menit. Hasil PCR kemudian dipisahkan secara elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 2% dalam Tris-Boric-EDTA (TBE) buffer 0,5 dan diamati dengan illuminator (UV) serta di dokumentasi dengan film polaroid.

Analisis Data

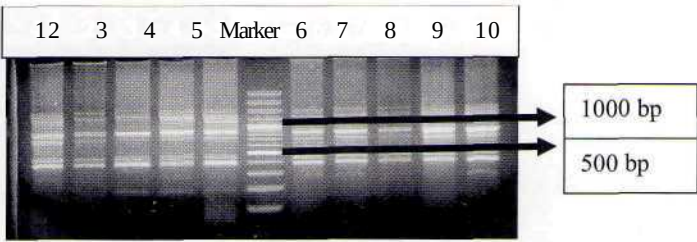
Heterosigositas merupakan perpaduan dari *alel-alel* yang berbeda pada lokus yang sama dihitung berdasarkan persamaan Hardy-Weinberg, (Nei, 1978 dalam Miller, 1997), Program *Tools for Population Genetic Analysis* (TFPGA) digunakan untuk mencari kekerabatan antar perlakuan yang dihitung menurut Wright (1978) modifikasi dari Rogers (1972) dalam



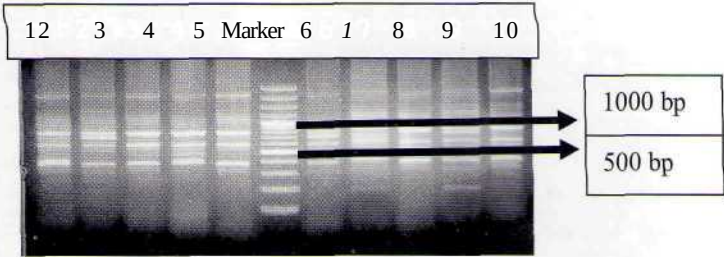
Gambar 1. Ikan Kelabau



Gambar 2. Profil RAPD OPA-13 ikan Kelabau asal Sintang



Gambar 3. Profil RAPD OPA-13 ikan Kelabau asal Kapuas Hulu



Gambar 4. Profil RAPD OPA-13 ikan Kelabau asal Pontianak

Tabel 1. Nilai Polimorfisme dan Heterozigositas Ikan Kelabau

No.	Keterangan	Populasi		
		Kelabau Pontianak	Kelabau Kapuas Hulu	Kelabau Sintana
1.	PoHmovfisme	21.0526%	5,2632%	57.8947%
2.	Heterozigositas	0,0964	0.0100	0,1651

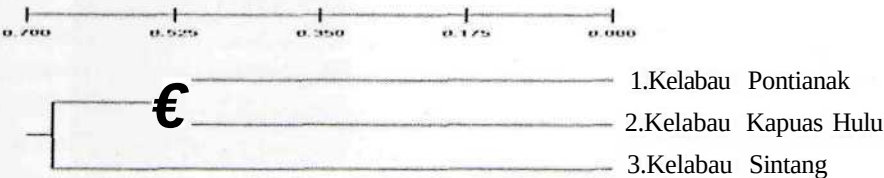
Tabel 2. Nilai P dari Uji Perbandingan Berpasangan Fst

Populasi	Kelabau Pontianak	Kelabau Kapuas Hulu	Kelabau Sintang
Kelabau Pontianak	****		
Kelabau Kapuas Hulu	0,0000	****	
Kelabau Sintang	0,0000	0,0000	****

Keterangan: Semua Berbeda Nyata

Tabel 3. Jarak Genetik Ikan Kalabau Pontianak, Kapuas Hulu dan Sintang

Populasi	Kelabau Pontianak	Kelabau Kapuas Hulu	Kelabau Sintang
Kelabau Pontianak	****		
Kelabau Kapuas Hulu	0.5351	****	
Kelabau Sintang	0,6852	0,6497	****



Gambar 5. Dendrogram Ikan Kelabau Pontianak, Kapuas Hulu dan Sintang

Miller (1997), sedangkan jarak genetik dan dendrogram dilakukan dengan analisis kluster hirarki.

HASIL

Ikan Kelabau dari Kalimantan Barat yakni *Osteochilus melanopleura* (Bleeker, 1852) dan *Osteochilus kelabau* (Popta, 1904), seperti tercantum dalam foto di bawah.

Primer OPA-13 mempunyai fragmen yang dapat digunakan sebagai pembeda antara populasi ikan kelabau yang diuji. Profil RAPD menggunakan primer OPA-13 dari sampel ikan Kelabau yang diuji disajikan dalam Gambar 2,3 dan 4.

Keragaman genetik yang ditentukan oleh nilai rata-rata heterozigositas dan persentase polimorfisme ikan Kelabau yang dianalisis disajikan dalam Tabel 1. Nilai polimorfisme maupun heterozigositas tertinggi yaitu pada ikan Kelabau Sintang, sedangkan yang terendah adalah Kelabau Kapuas Hulu (Tabel 1). Nilai polimorfisme ikan kelabau ini relatif rendah yaitu sekitar 5-58%, demikian pula dengan nilai rata-rata heterozigositasnya yaitu berkisar antara 0,0100 -0,1651.

Secara statistik dengan menggunakan uji perbandingan berpasangan Fst (Tabel 2), terdapat perbedaan nyata antara ketiga populasi ikan yang diuji yaitu antara ikan Kelabau Pontianak, Kapuas Hulu dan Sintang ($P < 0,01$).

Berdasarkan perhitungan jarak genetik dari ketiga lokasi pengambilan ikan Kelabau yang berbeda di Kalimantan Barat, diperoleh nilai jarak genetik terdekat adalah antara Kelabau Pontianak dengan Kelabau Kapuas Hulu yaitu sebesar 0,5351 (Tabel 3), sedangkan jarak paling jauh adalah jarak genetik antara antara Kelabau Pontianak dengan Kelabau Sintang (0,6852).

PEMBAHASAN

Berdasarkan nilai rata-rata heterozigositas dan persentase polimorfisme ikan Kelabau, terlihat bahwa keragaman genetik ikan Kelabau yang ada di Kalimantan Barat ini sangat rendah dibandingkan dengan jenis ikan air tawar lainnya. Keragaman genetik yang rendah merupakan ciri umum dari jenis ikan-ikan air tawar seperti ikan batak *Tor sorro* (Asih et al., 2008; Nugroho et al., 2006), ikan butini *Glossobius matanensis* (Mamangkey et al., 2007), ikan Baung *Afystus nemurus*

(Nugroho et al., 2005) dan ikan nila *Oreochromis mossambicus* (Arifin et al., 2007).

Keragaman genetik yang rendah pada ikan Kelabau ini kemungkinan disebabkan oleh terbatasnya migrasi ikan Kelabau sehingga peluang terjadinya pertukaran gen dengan populasi lain sangat kecil.

Pencemaran lingkungan dan praktek penyetruman menyebabkan populasi ikan Kelabau menurun. Jumlah populasi ikan yang terbatas menyebabkan peluang terjadinya perkawinan sekerabat atau *inbreeding* sangat besar. Hal ini berdampak pada penurunan keragaman genetik ikan Kelabau tersebut. Keragaman genetik mempunyai arti penting dalam stabilitas dan ketahanan populasi seperti pencegahan terhadap *kehilangan fitness* individu yang disebabkan oleh *inbreeding* yang dapat mengakibatkan kepunahan karenasifat yang seragam (Ferguson et al., 1950). Leary et al. (1985) memaparkan bahwa keragaman genetik yang rendah akan berakibat negatif terhadap sifat penting dalam makhluk hidup seperti kecilnya sintasan suatu organisme, berkurangnya pertumbuhan, dan keragaman ukuran, serta turunnya kemampuan adaptasi. Menurut Frankham (1999) kehilangan keragaman genetik akan mengurangi kemampuan spesies tersebut untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan. Individu dengan keragaman genetik yang tinggi akan mempunyai *komponen fitness* yang besar yang meliputi laju pertumbuhan, fekunditas, viabilitas, dan daya tahan terhadap perubahan lingkungan dan stres.

Berdasarkan hasil uji perbandingan berpasangan Fst (Tabel 2), terdapat perbedaan nyata antara ketiga populasi ikan yang diuji yaitu antara ikan Kelabau Pontianak, Kapuas Hulu dan Sintang ($P < 0,01$). Meskipun ikan Kelabau tersebut masih merupakan spesies yang sama, namun ketiga populasi ikan asal Kalimantan Barat ini berada di lokasi yang cukup berjauhan sehingga terdapat perbedaan yang nyata antara ketiga populasi tersebut. Menurut Iguchi (1999) dalam Rina (2001) isolasi karena perbedaan jarak merupakan salah satu faktor yang perlu dipertimbangkan akan mempengaruhi laju aliran gen antar lokasi yang terpisah dan pada akhirnya akan mengakibatkan meningkatnya perbedaan genetik.

Berdasarkan nilai jarak genetik terlihat bahwa meskipun lokasi ikan Kelabau Pontianak dengan Sintang secara geografis lebih dekat dibandingkan dengan Kapuas Hulu, namun hubungan kekerabatan ikan Kelabau dari Pontianak lebih dekat dengan ikan Kelabau dari Kapuas Hulu dibandingkan dengan Sintang. Hal ini karena ikan Kelabau asal Sintang berbeda spesies dengan ikan Kelabau asal Pontianak dan Kapuas Hulu. Berdasarkan bentuk morfologinya seperti terlihat pada Gambar 1, ikan Kelabau asal Sintang cenderung masuk ke dalam spesies *Osteochilus melanopleura* sedangkan ikan kelabau asal Pontianak dan Kapuas Hulu teridentifikasi sebagai spesies *Osteochilus kelabau*.

KESIMPULAN

Nilai polimorfisme maupun heterozigositas tertinggi yaitu ikan Kelabau Sintang, sedangkan terendah adalah Kelabau Kapuas Hulu. Berdasarkan perhitungan jarak genetik diperoleh nilai jarak genetik terdekat antara Kelabau Pontianak-Kapuas Hulu sebesar 0,5351, sedangkan terjauh antara Kelabau Pontianak-Sintang yaitu 0,6852.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberto F, R Santos R and JM Leitao. 1999. Assessing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. *Marine Ecologies Progress Series* 191, 101-108.
- Arifin OZ dan T Kurniasih. 2007. Variasi genetik tiga populasi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) berdasarkan polimorfisme mt-DNA. *Jurnal Riset Akuakultur* 2(1), 67-75.
- Asih S, E Nugroho, AH Kristanto dan Mulyasari. 2008. Penentuan variasi genetik ikan batak (Tor sorro) dari Sumatera Utara dan Jawa Barat dengan metode analisis *Randomly Amplified Polymorphism DNA (RAPD)*. *Jurnal Riset Akuakultur* 3 (1), 91-97.
- Bárfai R, S Egedi, GH Yue, B Kovács, B Urbányi, GTamás, L Horváth and L. Orbán. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. http://www.tll.org.sg/publications/0301_bartfai_aqua.pdf. [2 September 2008]
- Beaumont AR and Hoare K. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Science, Ltd, UK.
- Callejas C and MD Ochando. 2002. Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity* 89, 36-43. <http://www.nature.com/hdy/journal/v89/nl/full/6800091a.html>. [2 September 2008]
- Dudley RG. 1996. *The Fishery of Danau Sentarum Wildlife Reserve*. West Kalimantan. Indonesia. A.W.B. Bogor. Indonesia. P. 1-10.
- Dunham RA. 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. CABI publishing, UK. 372 pp.
- Frankham R. 1999. Quantitative genetic in conservation Biology. *Genetics. Pres.Cam.* 74, 237-244.
- Ferguson AI, AJ Taggart, PA Prodohl, O Mcmeel, C Thompson, C Stone, P Meginnity and RA Hynes. 1995. The application of molecular markers to study and conservation of fish population, with special reference to salmon. *Journal of Fish Biology* 47,103-126.
- Jayasangkar P. 2005. *Application of RAPD and AFLP to detect genetic variation in fishes*. In : Fish Genetic and Aquaculture Biotechnology, Eds: T.J. Pandian, C.A. Strussmann, M.P. Marian. Science Publisher, Inc., USA. p 29-36.
- Kristanto, AH, S Asih, MF Sukadi dan Yosmaniar. 2008. Prospek Ikan Kelabau (*Osteochilus melanopleura* Blkr), Tengalan (*Puntius bulu*) dan Tengadak (*Puntius* sp) Sebagai Ikan Budidaya Baru. *Prosiding Seminar Nasional Perikanan 2008*. Sekolah Tinggi Perikanan Jakarta. Hal 133-135.
- Leary RF, FW Allendorf and KL Knudsen. 1985. Development instability and high meristic counts in interspecific hybrid of salmonid fishes. *Evolution* 39, 1318-1326.
- Liu Z. 2007. *Randomly amplified polymorphism DNA (RAPD)*. In : Aquaculture Genome Technologies, Eds: Z .Liu. Blackwell Publishing, USA.
- Miller MP. 1997. *Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3*. Department of Biological Science. Northern Arizona University, Arizona, USA.
- Nugroho E, W Hadie, J Subagja dan T Kurniasih. 2005. Variasi genetik dan morfometrik pada ikan baung *mystus nemurus* dari Jambi, Wonogiri dan Jatiluhur. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 11 (7), 1-6.
- Nugroho EJ, Subagja S, Asih dan T Kurniasih. 2006. Bvaluasi variasi genetik ikan kancra dengan menggunakan marker mt-DNA D-loop dan *Randomly Amplified Polymorphism DNA (RAPD)*. *Jurnal Riset Akuakultur* 1 (2), 211-217.
- Parenrengi A, Sulaeman, W Hadi dan A Tenriulo. 2007. Keragaman morfologi udang pama (*Penaeus simiculatus*) dari perairan Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara. *Jurnal Riset Akuakultur* 2 (1): 389-397.
- Rina. 2001. Keragaman genetik ikan pangasius Indonesia berdasarkan analisis mitokondria DNA dengan teknik PCR-RFLP. Tesis. Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. 47 hal.
- Vibert R. 1959. Dispositif Vertical D'Incubation En Masse, *Bui. Franc. Pisciculture.* 31 (192), 104-115.