

Aplikasi DNA Barcode Pada Ikan Patin Siam (*Pangasius hypophthalmus*) dan Ikan Riu (*Pangasius macronema*) Berdasarkan Gen Sitokrom C Oksidase Subunit I (COI)

DNA Barcode Application Of Striped Catfish (*Pangasius hypophthalmus*) and Asian Catfish (*Pangasius macronema*) Based On Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI)

M. Rifqi Nanda Pratama¹⁾, Mochamad Syaifudin^{2*)}, Muslim³

¹ Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya

^{*)}Penulis untuk korespondensi: Tel./Faks. +6282177933568

email: msyaifudin76@gmail.com

ABSTRACT

Pangasius sp. are found in freshwater areas of Indonesia, Vietnam, Thailand and China. In Indonesia, there are 6 species of pangasius. The purposes of this research are to identify the genetic authentication of *Pangasius macronema* and *Pangasius hypophthalmus* based on the gene sequence of cytochrome c oxidase subunit I of mitochondrial DNA (COI mtDNA) and determine the phylogenetic tree between species of pangasius. The methods used to identify the species and sequence diversity were DNA isolation, amplification by PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and sequencing of COI gene mtDNA. *Pangasius macronema* was obtained from Penukal river at Air Hitam sub-district in Penukal Abab Lematang Ilir (PALI) regency and *Pangasius hypophthalmus* were taken from fish culture at Pasir Putih in Banyuasin. The result sequence of COI gene in Asian catfish was 579 bp and the striped catfish was 607 bp. Asian catfish (*P. macronema*) had similarity 95% to *P. macronema* (Vietnam). Meanwhile striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) had similarity 100% to *P. hypophthalmus* (Afrika and Thailand).

Keywords: cytochrome c oxidase subunit I (COI), DNA barcoding, *Pangasius* sp

ABSTRAK

Ikan patin (*Pangasius* sp.) banyak ditemukan di perairan tawar Indonesia, Vietnam, Thailand dan China. Di Indonesia terdapat sekitar 6 spesies ikan patin yang tersebar secara luas. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi status genetik dari spesies ikan patin siam dan ikan riu berdasarkan sekuens gen sitokrom c oksidase subunit I DNA mitokondria dan mengetahui pohon filogenetik antar spesies ikan patin. Metode yang digunakan dalam identifikasi spesies dan variasi sekuens adalah dengan melakukan isolasi DNA, Amplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan sekuensing gen COI mt DNA. Ikan riu yang diperoleh dari Sungai Penukal Desa Air Hitam di Kabupaten PALI (Penukal Abab Lematang Ilir) dan ikan patin siam yang diambil dari budidaya di pasir putih, Banyuasin. Hasil sekuensing gen COI pada ikan riu diperoleh 579 bp dan ikan patin siam diperoleh 607 bp. Ikan riu (*P. macronema*) memiliki kekerabatan yang dekat sebesar 95% dengan spesies *P. macronema* (Vietnam). Sedangkan ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) memiliki kekerabatan yang dekat sebesar 100% dengan *P. hypophthalmus* (Afrika dan Thailand).

Kata kunci: DNA barcode, *Pangasius* sp., sitokrom c oksidase subunit I (COI)

PENDAHULUAN

Ikan patin (*Pangasius* sp.) termasuk salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi di masyarakat. Ikan ini mempunyai beberapa kelebihan yaitu pertumbuhan cepat, dapat memanfaatkan makanan tambahan, serta dapat dipelihara pada perairan yang tidak mengalir. Ikan patin memiliki beberapa spesies dan banyak tersebar di berbagai negara seperti Vietnam, Thailand, dan Indonesia. Ikan patin di Indonesia sendiri banyak tersebar di Sumatera dan Kalimantan. Ikan patin memiliki beberapa spesies diantaranya *Pangasius poluranodo* (ikan juaro), *Pangasius macronema* (ikan riu), *Pangasius micronemus* (wakal), *Pangasius djambal* (Patin jambal), *Pangasius nasutus* (pedado) dan *Pangasius nieuwenhuisii* (lawang). Jenis-jenis ikan patin ini merupakan jenis ikan yang berada di perairan umum di Indonesia (Tahapari *et al.*, 2007).

Salah satu jenis ikan yang sering ditemui di Indonesia adalah spesies *Pangasius macronema* atau sering disebut dengan ikan riu. Ikan riu banyak tersebar di perairan Jawa, Sumatera, Kalimantan, Vietnam serta Thailand. Ikan riu ini merupakan ikan yang memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya memiliki daging yang berwarna putih dan memiliki lemak yang cenderung sedikit dibanding ikan patin yang lainnya (Daelami, 2001).

Jenis ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) merupakan spesies ikan patin yang paling banyak dipelihara dan dibudidayakan di Indonesia. Ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) merupakan salah satu komoditas ikan konsumsi air tawar yang bernilai ekonomis cukup tinggi. Produksi ikan patin menunjukkan kenaikan yang cukup signifikan pada tahun 2012 mencapai 651.000 ton per tahun dan pada tahun 2013 meningkat menjadi 972.778 ton per tahun (Kementerian Kelautan Dan Perikanan, 2013). Ikan patin siam dapat berkembang pesat dimasyarakat karena memiliki berbagai keunggulan, diantaranya proses budidaya yang mudah, pertumbuhannya cepat, dan relatif lebih tahan terhadap serangan penyakit (Susanto dan Amri, 2002). Ikan patin siam diintroduksi dari Thailand pada tahun 1972. Adanya ikan patin yang diintroduksi ke Indonesia dapat berpeluang besar terjadinya hibridisasi dengan spesies patin lainnya. Saat ini telah banyak dilakukan proses hibridisasi antara spesies ikan khususnya ikan patin, yang bertujuan untuk mendapatkan keturunan yang unggul (Kurniasih dan Gustiano, 2007). Pemanfaatan teknik hibridisasi ikan patin telah dilakukan, salah satu contoh hasil hibridisasi antar spesies ikan patin yaitu patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) dengan patin nasutus (*Pangasius nasutus*) menghasilkan hibrida yang memiliki pertumbuhan lebih baik (Hadie *et al.*, 2010). Persilangan sifat-sifat dapat dilakukan pada individu yang memiliki tingkat kekerabatan yang dekat maupun jauh. Namun, banyak spesies-spesies yang memiliki kemiripan secara morfologis dan sulit untuk diidentifikasi hubungan kekerabatannya, sehingga sulit untuk menentukan status genetik ikan patin tersebut. Maka dari itu diperlukan kajian mengenai kekerabatan genetik pada ikan patin dengan menggunakan sekuens gen COI sebagai *barcode*.

DNA (*Deoxyribose Nucleic Acid*) *barcoding* merupakan suatu sistem yang dirancang untuk identifikasi suatu spesies secara tepat dan akurat dengan menggunakan wilayah gen yang pendek dan terstandar (Hebert *et al.*, 2003). Salah satu metode yang digunakan adalah COI (*Cytochrome C Oxidase Subunit I*). Metode dengan menggunakan gen COI memiliki beberapa keunggulan yaitu proses amplifikasi yang mudah, hasil sekuennya lebih baik dan teknologi ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi sampai ke tingkat spesies (Hajibabaei *et al.*, 2006). Sekuen ini banyak digunakan sebagai *Barcode of life* untuk identifikasi suatu spesies. Segmen dekat ujung 5' dari COI sepanjang sekitar 650 basa merupakan daerah yang banyak digunakan sebagai DNA barcode beberapa

diantaranya yaitu pada kelompok *catfish* (Wong *et al.*, 2011), kelompok tilapia (Syaifudin *et al.*, 2015) dan ikan hiu (Peloa *et al.*, 2015).

Metode lain yang sering di pakai sebagai penanda DNA yaitu RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) yang dikenal sebagai penanda yang relatif murah tetapi memberikan hasil yang berbeda-beda (tidak akurat) apabila diulang. RAPD merupakan Metode analisis DNA yang menggunakan 1 primer dan hanya terdiri dari 10 pasangan basa. Metode RAPD digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA yang digunakan sebagai genetik marker dan menentukan hubungan kekerabatan suatu makhluk hidup (Williams, 1990). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sekuens nukleotida gen COI sebagai DNA barcode spesies ikan riu dan patin siam serta dibandingkan dengan spesies lain yang sudah terdaftar di pusat data *GenBank* dan menentukan struktur filogenetik, jarak genetik serta persentase nukleotida ikan riu dan patin siam.

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sampel ikan patin, Etanol 96%, Aquadest, Aquabidest, Agarose, Buffer TAE (Tris- Acetate EDTA), bahan PCR (larutan buffer Phusion HF, dNTPs, air bebas-nuklease, PCR kit dari KAPA HiFi *Hot Start Ready Mix*, DNA template, primer *Reverse 2* dan *Forward 2*) serta Kit ekstraksi DNA dari *GeneAid* (Proteinase K, *Wash buffer*, *Elution buffer*, *w1 buffer*, *GT Buffer* dan *GBT buffer*).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pinset, DO meter, DNA Marker, Elektroforesis, *Freezer*, Gunting, Kit ekstraksi DNA genom (*mikropestle*, kolom GD dan kolom GS), *Gel documentation*, Inkubator, Mikropipet, *mikrosentrifuge*, *sentrifuge*, pH meter, *Secchi disk*, Spektrofotometer, *Thermocycler*, Tabung PCR 0,2 ml, Tabung 1,5 ml, Termometer, Vortex.

Pengambilan Sampel

Sampel ikan riu diambil di sungai Penukal Desa Air Hitam Kecamatan Penukal Kabupaten PALI dan sampel ikan patin siam diambil di lokasi budidaya Pasir Putih Banyuasin. Sampel ikan diambil masing-masing sebanyak 5 individu dalam keadaan hidup dan dimasukkan ke dalam kantung plastik beroksigen untuk selanjutnya diambil sebagian siripnya untuk dianalisa DNA. Sampel sirip disimpan dalam larutan etanol 96%, kemudian diberi label dan disimpan pada suhu 4°C hingga dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA

Total genom DNA diekstraksi menggunakan Kit Ekstraksi DNA genom (*GeneAid*) mengikuti metode yang terdapat di manual. Secara umum, ekstraksi DNA terdiri dari 5 tahap: lisis sel, perlakuan RNase, presipitasi DNA, pencucian dan pelarutan DNA. Tahap inkubasi RNase dilakukan untuk mengurangi kontaminasi RNA. Setiap sampel sirip (sekitar 2 mm²) digunakan dalam isolasi DNA. Sampel DNA selanjutnya disimpan dalam *freezer* (-30°C).

Amplifikasi DNA

Proses amplifikasi DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA ikan patin yang diperoleh dari hasil ekstraksi (lima individu setiap spesies) yang digunakan untuk mendapatkan gen COI berukuran 655 bp dari DNA mitokondria dengan pasangan primer FishF2-5' TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC 3' dan FishR2-5' ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA 3' (Ward *et al.*, 2005). PCR dilakukan dalam volume akhir 40 µl. Setiap reaksi mengandung 14,8 µl aquabidest, 20 µl 2X KAPA HiFi *Editor: Siti Herlinda et. al.*

Hotstart ReadyMix, 1,6 µl 10 µM FishR2 primer, 1,6µl 10 µM FishF2 primer dan 2 µl DNA *template*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan tahapan : siklus inisiasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 98°C selama 20 detik, *annealing* atau pelekatan primer pada suhu 56°C selama 40 detik, *Extension* atau elongasi 72°C selama 15 detik dalam 30 siklus dan perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 1 menit. Produk PCR divisualisasi melalui elektroforesis gel agarose 1% dengan daya 75V selama 50 menit. Ukuran DNA hasil PCR dielektroforesis dengan menggunakan marker 1 Kb.

Sekuensing Gen COI

Sampel DNA ikan patin yang berhasil diamplifikasi menggunakan PCR kemudian disekuensing pada daerah target gen COI. Produk PCR yang telah diketahui ukuran menggunakan marker 1 Kb dan integritas DNANYa menggunakan elektroforesis kemudian disekuensing melalui jasa Lembaga *Genetica Science*.

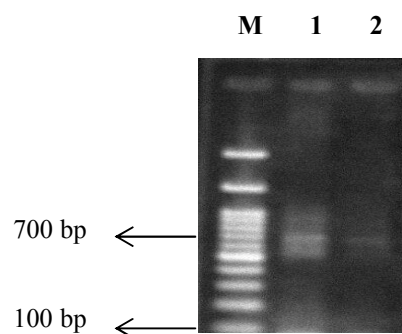
Analisis Data

Sekuens COI yang telah didapatkan dalam bentuk fasta format kemudian dilakukan alignment menggunakan software MEGA 7.0, lalu diambil sekuens yang telah sejajar untuk kemudian BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang berguna untuk menentukan homologi suatu urutan DNA atau asam amino dengan data yang terdapat di *Genbank* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) dan *Barcode of Life*. Sebagai perbandingan, sekuens COI ikan patin juga didapatkan dari data *Genbank* NCBI. Selanjutnya semua sekuens dilakukan *alignment* (pensejajaran) untuk dianalisa jarak genetik dan pohon filogenetiknya dengan metode NJ(*Neighbor Joining*).

HASIL

Karakteristik Molekuler

Hasil elektroforesis gen COI dari ikan patin pada penyinaran dengan sinar UV menunjukkan ukuran sekitar 700 bp (Gambar 1). Berdasarkan penelitian Ward *et al.*, (2005) mengenai DNA barcoding pada ikan-ikan di Australia, penggunaan kombinasi primer FishF2 dan FishR2 akan menghasilkan DNA target yang memiliki fragmen gen COI sekitar 655bp.



Gambar 1. Visualisasi Produk PCR dari gen COI ikan riu dan patin siam

Keterangan : M : Marker ukuran 1 Kb

1: Sampel ikan riu (*Pangasius macronema*)

2: Sampel ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*)

Berdasarkan hasil sekuensing didapatkan urutan basa nukleotida kedua primer. Kemudian dilakukan proses editing sekuens dan didapatkan urutan basa nukleotida yang dinilai paling sejajar dari kedua primer pada sampel ikan riu dan patin siam masing-masing

Editor: Siti Herlinda *et. al.*

ISBN : 978-979-587-748-6

sebesar 579 bp untuk ikan riu dan 607 bp untuk ikan patin siam. Selanjutnya dilakukan analisis BLAST pada ikan patin melalui website *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* (NCBI). BLAST adalah program berbasis bioinformatik dengan tujuan untuk mencari kesejajaran dari bagian urutan basa nukleotida atau asam amino (*localalignment*) yang memiliki nilai yang paling tinggi. BLAST dapat digunakan sebagai alat untuk menentukan identitas suatu fragmen DNA yang belum diketahui berdasarkan tingkat homologi dengan gen atau fragmen DNA yang telah diketahui di *GenBank* (Mount, 2001).

Persentase identitas ikan riu (*Pangasius macronema*) dan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) dari hasil BLAST nukleotida dengan data di *Genbank*.dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Persentase identitas nukleotida ikan riu dari hasil BLAST

No	Deskripsi	Identity(%)	Akses	Asal Sampel
1.	<i>Pangasius macronema</i>	95	KT289892.1	Vietnam
2.	<i>Pangasius macronema</i>	95	KT289890.1	Vietnam
3.	<i>Pangasius macronema</i>	95	KT289891.1	Vietnam
4.	<i>Pangasius micronemus</i>	92	HM156360.1	Malaysia
5.	<i>Pangasius micronemus</i>	92	KP036424.1	Malaysia
6.	<i>Pangasius micronemus</i>	92	KU692816.1	Perancis
7.	<i>Pangasius conchophilus</i>	92	EF609426.1	Australia
8.	<i>Pangasius conchophilus</i>	92	KT289886.1	Vietnam
9.	<i>Pangasius nasutus</i>	92	KT001045.1	Malaysia
10.	<i>Pangasius krempfi</i>	90	KT289877.1	Vietnam

Tabel 2. Persentase identitas nukleotida ikan patin siam dari hasil BLAST

No	Deskripsi	Identity(%)	Akses	Asal Sampel
1.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	100	KU568951.1	Afrika
2.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	100	KU568950.1	Afrika
3.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	100	KR080263.1	Thailand
4.	<i>Pangasius sanitwongsei</i>	100	JN020073.1	Cina
5.	<i>Pangasius sanitwongsei</i>	100	JN020072.1	Cina
6.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	100	KF604668.1	Filipina
7.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	99	KP036425.1	Malaysia
8.	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	100	KM232616.1	India
9.	<i>Pangasius conchophilus</i>	90	KT289886.1	Vietnam
10.	<i>Pangasius gigas</i>	91	KY118586.1	Thailand

Persentase identitas pada ikan riu (*P. macronema*) yang berasal dari PALI menunjukkan persen identitas yang paling tinggi yaitu dengan *P. macronema* yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas mencapai 95%. Sedangkan persen identitas terendah yaitu dengan *P. krempfi* yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas 90%.Dilihat dari habitat hidupnya *Pangasius krempfi* menghabiskan sebagian hidupnya di air payau karena ikan ini termasuk ikan *anadromus* atau ikan yang beruaya dari air payau ke air tawar (Roberts dan Baird, 1995).Hal ini merupakan salah satu faktor *Pangasius krempfi* memiliki persentase identitas yang rendah karena ikan ini berbeda dengan ikan patin jenis lainnya yang sebagian besar hidup di air tawar.

Persentase identitas ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) yang berasal dari Banyuasin menunjukkan nilai identitas yang paling tinggi yaitu dengan patin siam dari Afrika dan Thailand dengan persentase identitas mencapai 100%. Persen identitas terendah yaitu dengan *P. conchophilus* yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas

Editor: Siti Herlinda et. al.

ISBN : 978-979-587-748-6

mencapai 90%. Hal ini disebabkan karena salah satunya yaitu faktor lingkungan, karena spesies *P. conchophilus* selama hidupnya melakukan kegiatan migrasi dari hilir ke hulu untuk melakukan pemijahan (*spawning*) sehingga dapat mempengaruhi sifat genetik ikan tersebut karena faktor adaptasi ikan terhadap lingkungan (Roberts dan Vidthayanon, 1991).

Hubungan Kekerabatan

Jarak genetik adalah tingkat perbedaan gen (perbedaan genomik) pada suatu populasi atau spesies yang diukur melalui kuantitas numerik (Nei, 1972). Analisa jarak genetik dilakukan melalui pengurutan nilai dari yang terkecil hingga yang terbesar, ini bertujuan untuk memudahkan dalam pembacaan tingkat kekerabatan antar spesies ikan patin. Menurut Rasmussen *et al.*, (2009) rentang tingkat kekerabatan antar spesies ikan dapat diketahui apabila semakin jauh rentang nilai nya maka semakin jauh pula tingkat kekerabatan antar spesies tersebut. Sebaliknya apabila semakin kecil rentang nilai antar spesies maka semakin dekat pula tingkat kekerabatannya. Jarak genetik ikan patin disajikan pada Tabel 3.

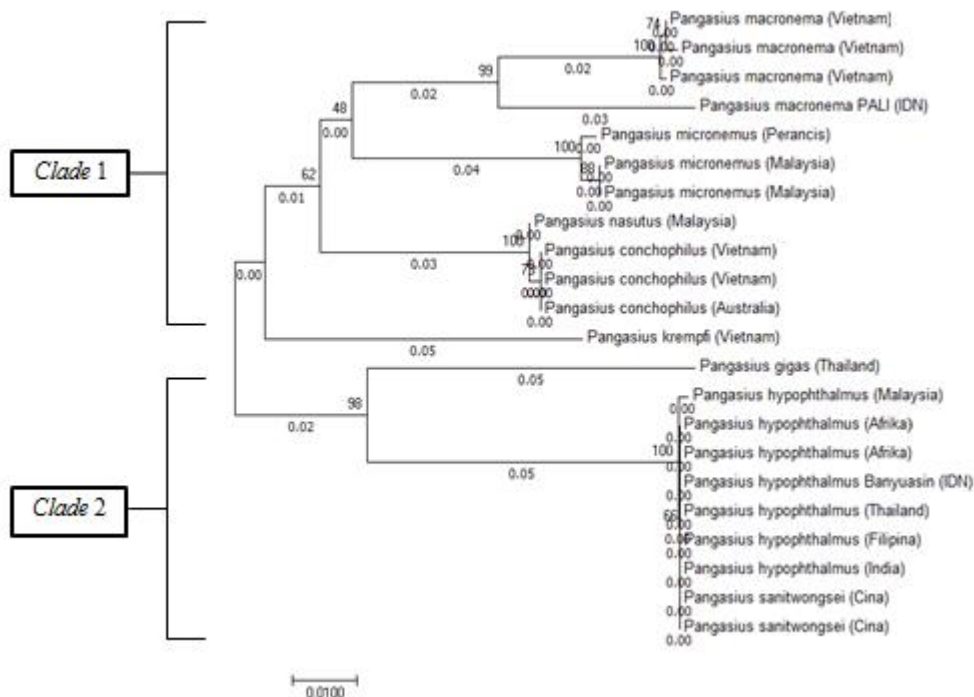
Tabel 3. Jarak genetik antar spesies ikan patin yang dibandingkan dengan data dari *Genbank*

No	Nama Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	<i>P. gigas</i> (Thailand) KY118886.1																						
2	<i>P. hypophthalmus</i> (Afrika) KU568950.1	0.10																					
3	<i>P. hypophthalmus</i> (Afrika) KU568951.1	0.10	0.00																				
4	<i>P. hypophthalmus</i> Banyuasin (IDN)*	0.10	0.00	0.00																			
5	<i>P. hypophthalmus</i> (Thailand) KR080263.1	0.10	0.00	0.00	0.00																		
6	<i>P. hypophthalmus</i> (Filipina) KF04668.1	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00																	
7	<i>P. hypophthalmus</i> (India) KM232616.1	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00																
8	<i>P. saniooensis</i> (Cina) JN020073.1	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00															
9	<i>P. saniooensis</i> (Cina) JN020072.1	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
10	<i>P. hypophthalmus</i> (Malaysia) KP036425.1	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
11	<i>P. conchophilus</i> (Vietnam) KT289886.1	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11												
12	<i>P. conchophilus</i> (Vietnam) KT289886.1	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.00											
13	<i>P. conchophilus</i> (Australia) EF609426.1	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.00	0.00										
14	<i>P. nasutus</i> (Malaysia) KT001045.1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00									
15	<i>P. micronemus</i> (Perancis) KU692816.1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08								
16	<i>P. micronemus</i> (Malaysia) KP036424.1	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.01							
17	<i>P. micronemus</i> (Malaysia) HM156360.1	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.01	0.00						
18	<i>P. krempfi</i> (Vietnam) KT289877.1	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09					
19	<i>P. macronema</i> (Vietnam) KT289891.1	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.11				
20	<i>P. macronema</i> (Vietnam) KT289890.1	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.11	0.00		
21	<i>P. macronema</i> (Vietnam) KT289892.1	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.00	0.00	
22	<i>P. macronema</i> PALI (IDN)*	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	0.12	0.06	0.06	0.05	

Analisis jarak genetik menggunakan metode *Pairwise Distances* di MEGA 7.0. Dari 20 data spesies yang didapatkan dari *Genbank* dan ditambah 2 spesies sampel, menunjukkan nilai jarak genetik ikan patin antara 0,00 sampai dengan 0,11. Menurut Avise (1998), jarak genetik pada spesies ikan yang sama kurang dari 2% dan kurang dari 0,1% dari taksa lain. Jarak genetik pada sampel ikan riu (*P. macronema*) dari PALI berdekatan

dengan spesies *P. macronema* dari Vietnam dengan nilai 0,05 sedangkan jarak genetik ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) dari Banyuasin identik dengan *P. hypophthalmus* (Afrika dan Thailand) dengan nilai 0,00. Menurut Mayr (1970), bahwa suatu populasi yang memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi, genetik dan dipengaruhi oleh keadaan lingkungan. Selain itu adanya proses hibridisasi juga dapat berpengaruh pada status genetik ikan tersebut.

Berdasarkan jarak genetik tersebut kemudian dilakukan analisa filogenetik. Pohon filogenetik dibentuk dari sekuen nukleotida spesies ikan riu (*Pangasius macronema*) dan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) serta dari spesies lain yang ada di *Genbank*. Penambahan data sekuen ikan patin spesies lainnya dari negara lain digunakan untuk mengetahui kekerabatan spesies asal perairan Indonesia berdasarkan sekuen COI khususnya spesies ikan patin di Sumatera Selatan dalam struktur pohon filogenetik. Filogenetik adalah gambaran kekerabatan berdasarkan komposisi urutan DNA atau protein yang berbentuk menyerupai pohon untuk memperkirakan proses evolusi (Baldauf, 2003). Rekonstruksi pohon filogeni dari ikan Patin menggunakan software MEGA7 dengan metode *Neighbor Joining* (NJ). Pohon filogenetik ikan patin dengan ikan-ikan lainnya dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Pohon filogenetik ikan patin asal perairan Sumatera Selatan dengan dengan ikan lainnya menggunakan metode *Neighbor joining* (NJ) dengan *bootstrap* 1000X.

Sekuen DNA mitokondria banyak digunakan dalam analisis pohon filogenetik karena memiliki laju evolusi yang cepat (Bargelloni *et al.* 1994). Suatu *Clade* disebut pula sebagai suatu kelompok monofiletik. Menurut Zein dan Sulandari (2009), suatu kelompok dikatakan bersifat monofiletik apabila keseluruhan nodus yang dikelompokkan lebih dekat satu sama lain secara genetik (hubungan tingkat kekerabatan) jika dibandingkan dengan kelompok lain yang berbeda garis keturunan. Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor joining* didapatkan hasil yaitu terbentuk dua *clade* ikan patin. Rekonstruksi pohon filogenetik menggambarkan bahwa panjang

Editor: Siti Herlinda *et. al.*

ISBN : 978-979-587-748-6

cabang menunjukkan jarak genetik. Semakin pendek cabang maka semakin dekat jarak genetiknya dan apabila semakin panjang cabang maka semakin jauh pula hubungan kekerabatannya (Zein dan Sulandari 2009).

Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik, terlihat bahwa ikan riu (*P. macronema*) menunjukkan nilai *bootstrap* sebesar 99%. Hal tersebut menunjukkan bahwa posisi filogenetik ikan riu dari PALI berada satu kelompok dengan *P. macronema* dari Vietnam. Hal ini disebabkan karena spesies ini tersebar luas di seluruh asia dari Pakistan sampai indo-cina dan kepulauan Indo-Malaya (Roberts dan Vidthayanon, 1991). Ikan riu sendiri memiliki beberapa keunggulan diantaranya memiliki daging yang berwarna putih dan memiliki lemak yang cenderung sedikit dibanding ikan patin yang lainnya sedangkan kekurangan dari ikan riu yaitu pertumbuhan yang lambat dan ukuran tubuh yang cenderung kecil (Daelami, 2001).

Ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) mempunyai *bootstrap* 100% dengan patin siam lainnya dengan cabang terdekat *P. hypophthalmus* dari Afrika dan Thailand. Dekatnya kekerabatan ikan patin siam pada hasil rekonstruksi pohon filogenetik ini dikarenakan ikan patin siam merupakan ikan introduksi dari Thailand yang masuk ke Indonesia pada tahun 1972 dan tersebar luas, serta masih sama dengan ikan asalnya dan kemungkinan belum adanya proses hibridisasi di daerah budidaya tersebut. Ikan patin siam mempunyai beberapa keunggulan yaitu pertumbuhan yang cepat serta ukuran tubuh yang cenderung lebih besar. Sedangkan kekurangan dari ikan patin siam yaitu memiliki daging yang cenderung kuning dan memiliki banyak lemak (Susanto dan Amri, 2002).

Dilihat dari sifat yang dimiliki masing-masing ikan, ini berpeluang dilakukan hibridisasi antara ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) dan ikan riu untuk menghasilkan strain baru yang lebih unggul. Menurut Hickling (1971), proses hibridisasi antar spesies ikan dapat mempengaruhi status genetik ikan. Hibridisasi pada ikan dapat dilakukan antar spesies dalam satu genus (interspesifik) dan antar genus dalam satu famili (intergenerik). Keberhasilan hibridisasi interspesifik dan intergenerik biasanya ditentukan oleh jauh dekatnya kekerabatan, semakin dekat tingkat kekerabatan maka semakin besar kemungkinan keberhasilannya (Sumantadinata, 1992). Salah satu contoh hasil hibridisasi antar spesies ikan patin yaitu ikan patin jenis Pasupati (patin super harapan pertiwi) yang merupakan hasil silangan antara ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) dengan ikan patin jambal (*Pangasius djambal*) asli Indonesia yang dilakukan oleh Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBPAT) Sukamandi (Susanto, 2009).

PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis gen COI dari ikan patin pada penyinaran dengan sinar UV menunjukkan ukuran sekitar 700 bp (Gambar 1). Berdasarkan penelitian Ward *et al.*, (2005) mengenai DNA barcoding pada ikan-ikan di Australia, penggunaan kombinasi primer FishF2 dan FishR2 akan menghasilkan DNA target yang memiliki fragmen gen COI sekitar 655bp. Berdasarkan hasil sekuensing didapatkan urutan basa nukleotida kedua primer. Kemudian dilakukan proses editing sekuen dan didapatkan urutan basa nukleotida yang dinilai paling sejajar dari kedua primer pada sampel ikan riu dan patin siam masing-masing sebesar 579 bp untuk ikan riu dan 607 bp untuk ikan patin siam. Selanjutnya dilakukan analisis BLAST pada ikan patin melalui website *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* (NCBI). Persentase identitas pada ikan riu (*P. macronema*) yang berasal dari PALI menunjukkan persen identitas yang paling tinggi yaitu dengan *P. macronema* yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas mencapai 95%. Sedangkan persen identitas terendah yaitu dengan *P.*

krempfi yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas 90%. Dilihat dari habitat hidupnya *Pangasius krempfi* menghabiskan sebagian hidupnya di air payau karena ikan ini termasuk ikan *anadromus* atau ikan yang beruaya dari air payau ke air tawar (Roberts dan Baird, 1995). Hal ini merupakan salah satu faktor *Pangasius krempfi* memiliki persentase identitas yang rendah karena ikan ini berbeda dengan ikan patin jenis lainnya yang sebagian besar hidup di air tawar.

Persentase identitas ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) yang berasal dari Banyuasin menunjukkan nilai identitas yang paling tinggi yaitu dengan patin siam dari Afrika dan Thailand dengan persentase identitas mencapai 100%. Persen identitas terendah yaitu dengan *P. conchophilus* yang berasal dari Vietnam dengan persentase identitas mencapai 90%. Hal ini disebabkan karena salah satunya yaitu faktor lingkungan, karena spesies *P. conchophilus* selama hidupnya melakukan kegiatan migrasi dari hilir ke hulu untuk melakukan pemijahan (*spawning*) sehingga dapat mempengaruhi sifat genetik ikan tersebut karena faktor adaptasi ikan terhadap lingkungan (Roberts dan Vidthayanon, 1991).

Dari hasil analisis jarak genetik menggunakan metode *Pairwise Distances* di MEGA 7.0, 20 data spesies yang didapatkan dari *Genbank* dan ditambah 2 spesies sampel, menunjukkan nilai jarak genetik ikan patin antara 0,00 sampai dengan 0,11. Menurut Avise (1998), jarak genetik pada spesies ikan yang sama kurang dari 2% dan kurang dari 0,1% dari taksa lain. Jarak genetik pada sampel ikan riu (*P. macronema*) dari PALI berdekatan dengan spesies *P. macronema* dari Vietnam dengan nilai 0,05 sedangkan jarak genetik ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) dari Banyuasin identik dengan *P. hypophthalmus* (Afrika dan Thailand) dengan nilai 0,00. Menurut Mayr (1970), bahwa suatu populasi yang memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi, genetik dan dipengaruhi oleh keadaan lingkungan. Selain itu adanya proses hibridisasi juga dapat berpengaruh pada status genetik ikan tersebut.

Setelah didapatkan hasil jarak genetik kemudian dilakukan analisa filogenetik. Berdasarkan hasil rekonstruksi pohon filogenetik, terlihat bahwa ikan riu (*P. macronema*) menunjukkan nilai *bootstrap* sebesar 99%. Hal tersebut menunjukkan bahwa posisi filogenetik ikan riu dari PALI berada satu kelompok dengan *P. macronema* dari Vietnam. Hal ini disebabkan karena spesies ini tersebar luas di seluruh asia dari Pakistan sampai indo-cina dan kepulauan Indo-Malaya (Roberts dan Vidthayanon, 1991). Ikan riu sendiri memiliki beberapa keunggulan diantaranya memiliki daging yang berwarna putih dan memiliki lemak yang cenderung sedikit dibanding ikan patin yang lainnya sedangkan kekurangan dari ikan riu yaitu pertumbuhan yang lambat dan ukuran tubuh yang cenderung kecil (Daelami, 2001).

Ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) mempunyai *bootstrap* 100% dengan patin siam lainnya dengan cabang terdekat *P. hypophthalmus* dari Afrika dan Thailand. Dekatnya kekerabatan ikan patin siam pada hasil rekonstruksi pohon filogenetik ini dikarenakan ikan patin siam merupakan ikan introduksi dari Thailand yang masuk ke Indonesia pada tahun 1972 dan tersebar luas, serta masih sama dengan ikan asalnya dan kemungkinan belum adanya proses hibridisasi didaerah budidaya tersebut. Ikan patin siam mempunyai beberapa keunggulan yaitu pertumbuhan yang cepat serta ukuran tubuh yang cenderung lebih besar. Sedangkan kekurangan dari ikan patin siam yaitu memiliki daging yang cenderung kuning dan memiliki banyak lemak (Susanto dan Amri, 2002).

KESIMPULAN

1. Hasil sekuensing gen COI pada ikan riu diperoleh nukleotida 579 bp sedangkan ikan patin siam diperoleh 607 bp.

Editor: Siti Herlinda et. al.

ISBN : 978-979-587-748-6

2. Ikan riu (*P. macronema*) dari PALI menunjukkan persen identitas yang paling tinggi (95%) yaitu dengan *P. macronema* (Vietnam) dengan jarak genetik (0,05) dan hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* 99%. Sedangkan ikan patin siam (*P. hypophthalmus*) menunjukkan nilai identitas yang paling tinggi (100%) dengan patin siam Afrika dan Thailand dengan jarak genetik (0,00) dan hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* 100%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ketua Program Studi Budidaya Pertanian, Laboran dan Teknisi di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, atas dukungan sarana dan prasarana. Penulis juga sangat menghargai dukungan Universitas Sriwijaya yang telah memberikan dana Hibah Penelitian Unggulan Kompetitif dengan nomor kontrak 042.01.2.400953/2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Awise, J.C, Walker, D dan Johns, G.C. 1998. Speciation durations and pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *The Royal Society* 265: 1707-1712.
- Bargelloni, L.P.A., Ritche, T., Patarnelo., Battaglia, B., Lambert, D.M dan Meyer, A. 1994. Molecular evolution at subzero temperatures: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (suborder Notothenioidei), and the evolution of antifreeze glycopeptides. *Molecular Biology and Evolution* 11:854-863.
- Baldauf, S.L. 2003. *Phylogeny for the faint of heart: a tutorial TRENDS in Genetics*. Vol.19 No.6 June 2003.
- Daelami, D.A.S. 2001. Usaha Pembenuhan Ikan Air Tawar. Penebar Swadaya (Anggota IKAPI). Jakarta. 166 hal.
- Hadie, W., Tahapari, E., Hadie, L.E dan Sulatro. 2010. Efektivitas Persilangan dalam Peningkatan Produktivitas Patin Melalui Hibridisasi Antar Spesies. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 10(2):183.
- Hajibabaei, M., Smith, M.A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., dan Hebert, P.D.N. 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes* 6:959–964.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S dan de Waard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc* 270: 96–99.
- Hickling, C.F. 1971. *Fish Culture and Faber*. ltd. London.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2013. Data Informasi Peningkatan Budidaya Ikan Patin Di Indonesia. Sumber : www.KKP.go.id.
- Kurniasih, T dan Gustiano, R. 2007. Hibridisasi sebagai alternatif untuk penyediaan ikan unggul. *Media Aquaculture* 2: 37-40.
- Mayr, E. 1970. Population Species and Evolution. Harvard University Press. England.
- Mount, D.W. 2001. *Bioinformatics, Sequence and Genome Analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between population. *American Nature*, 106: 283-292.
- Peloa, A., Wullur, S dan Sinjal, C.A. 2015. Amplifikasi Gen Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Dari Sampel Sirip Ikan Hiu Dengan Menggunakan Beberapa Pasangan Primer. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis* (1):38.

- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T dan Hebert, P.D.N. 2009. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (57): 8379-8385.
- Roberts, T.R dan Vidthayanon, C. 1991. Revision of the tropical Asian catfish family Pangasiidae with biological observations 1714 and descriptions of three new species. *Proceedings of the Philadelphia Academy of Natural Sciences* 143: 97-144.
- Roberts, T.R dan Baird, I.G. 1995. Traditional fisheries and fish ecology on the Mekong river at khone water falls in Southern Laos. *Natural history bulletin of the siam society* 43: 219-262.
- Sumantadinata, K. 1992. Penampilan Hibrida Ikan-Ikan Budidaya Air Tawar. Cetakan I. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 2(1): 41-48.
- Susanto, H dan Amri, K. 2002. *Budidaya Ikan Patin*. Penebar Swadaya. Jakarta 90 hal.
- Susanto, H. 2009. *Pembenihan dan Pembesaran Patin*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Syaifudin, M., Penman, D dan McAndrew, B. 2015. *Species-Spesific DNA Markers For Improving The Genetic Management Of Tilapia*, Thesis S2 (Publication). University of Stirling, Scotland-United Kingdom.
- Tahapari, E., Sularto dan Hadi, W. 2007. Hasil Riset Budidaya Ikan Patin. Makalah disampaikan pada acara lokakarya hasil riset. 14 pp.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Ines, B.H., Last, P.R dan Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1847-1857.
- Williams, J.G.K. 1990. *DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers*. *Nucleic Acids Research*.18, (22), 6531-6535.
- Wong, L.L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He S., Zhou C., Na-nakorn U dan Liu Z. 2011. DNA Barcoding Of Catfish: Species Authentication And Phylogenetic Assessment. *PLoS ONE*. 6(3): 1-7.
- Zein, M.S dan Sulandari, S. 2009. Investigasi asal usul ayam Indonesia menggunakan sekuens hypervariable-1 d-loop DNA mitokondria. *Veteriner Maret*. 10: 41-49.