

## Keragaman dan kekerabatan genetik pada ikan patin

Ibnu Dwi Buwono<sup>1)</sup>, Afa Soraya<sup>2)</sup>, Yeni Mulyani<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran  
Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor. Telp.022-87701519 Faks. 022-87701518

<sup>2)</sup> Alumni Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran  
Surel: [ibnudw1@yahoo.com](mailto:ibnudw1@yahoo.com). Telp. 0818616058

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi jenis ikan patin yang memiliki variasi genetik dan hubungan kekerabatan genetik diantara patin uji. Sampel ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) yang diperoleh berasal dari Cijengkol dan Subang, patin pasupati (*Pangasius* sp.) dari Subang, patin jambal (*Pangasius jambal*) dari Cirata, patin mekong giant catfish (*Pangasionodon gigas*) dan patin genghis khan (*Pangasius sanitwongsei*) dari toko ikan hias Jakarta. Berdasarkan hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-02 (5'-tgccgagctg-3') dan OPA-03 (5'-agttagccac-3'), variasi genetik yang diinterpretasikan dengan jumlah fragmen polimorfik terbanyak berturut-turut terdapat pada sampel patin genghis khan, patin mekong giant catfish, patin pasupati, dan patin jambal. Hasil analisis program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) dari ampikon primer OPA-02 dan OPA-03, menunjukkan hubungan kekerabatan genetik ikan patin siam, patin jambal, patin pasupati tergolong dekat (indeks kesamaan 71,3 % dan 55,9 %), sebaliknya pada patin mekong giant catfish dan genghis khan tergolong jauh (indeks kesamaan 44 % dan 50 %).

Kata kunci: keragaman, kekerabatan, ikan patin

### Pendahuluan

Patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) sebagai ikan budi daya merupakan komoditas ikan air tawar bernilai ekonomis dalam memenuhi kebutuhan pangan masyarakat dengan fekunditas telur tinggi dapat mencapai 100.000 butir/kg (Khairuman 2007). Ikan patin ini berasal dari Thailand dan pertama kali diintroduksi di Indonesia pada tahun 1972. Jenis ikan patin lain, yaitu ikan patin jambal (*Pangasius djambal* Bleeker) merupakan salah satu jenis populer yang berpeluang menjadi komoditas ekspor berhasil dipijahkan secara kawin buatan pada tahun 1997 dan diperkenalkan pada tahun 2001. Selain sebagai ikan konsumsi, beberapa jenis patin pun dapat dijadikan sebagai ikan hias, diantaranya yang banyak dikenal di Indonesia adalah patin genghis khan (*Pangasius sanitwongsei*) dan mekong giant catfish (*Pangasionodon gigas*). Seiring berkembangnya teknologi pembenihan, rekayasa persilangan dengan kesamaan genus, maupun spesies melalui program hibridisasi dilakukan pada ikan patin jambal dan patin siam menghasilkan patin hibrid yang dikenal dengan patin pasupati (*Pangasius* sp.) oleh Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBAT) Sukamandi, Subang, Jawa Barat. Daging ikan patin pasupati yang berwarna putih tersebut merupakan kriteria penting untuk memenuhi kuota ekspor patin berdaging putih (Khairuman & Amri 2010).

Perkembangan lebih lanjut budi daya ikan patin pada pembudidaya, menghasilkan variasi genetik ikan yang cenderung menurun dibandingkan induknya. Meningkatnya kegiatan persilangan patin dengan jenis yang sama, banyak terjadi pada unit pembenihan rakyat sehingga menyebabkan sifat genetik yang diturunkan dari induk pendahulunya mengalami degradasi. Imron *et al.* (2000) menyatakan bahwa indikasi

penurunan kualitas genetik ikan ditandai dengan sifat-sifat seperti pertumbuhan lambat, meningkatnya mortalitas, dan matang kelamin dini. Penyebab hal ini diduga karena banyak terjadi silang dalam (*inbreeding*) diantara induk ikan yang dipijahkan. Informasi variasi genetik dapat diperoleh melalui beberapa cara, salah satunya dengan pendekatan keragaman genotip yaitu melalui analisis polimorfisme DNA. Polimorfisme menunjukkan adanya individu-individu dengan fenotip yang berbeda dalam populasi pada suatu ekosistem ataupun habitat (Nursida 2011). RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk melihat keragaman genetik, jarak genetik dan konstruksi pohon filogeni serta hubungan kekerabatan yang terjadi diantara spesies atau strain ikan. Teknik RAPD dilakukan oleh Liu *et al.* (1999) untuk melihat pemetaan gen dan variasi genetik dari ikan channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Koh *et al.* (1999) melakukan teknik RAPD untuk melihat jarak genetik antara ikan discus (*Symphysodon* spp.) yang diperoleh dari alam dengan ikan hasil budi daya. Oleh karena variasi dan jarak genetik dapat berpengaruh pada perbaikan kualitas genetik ikan patin, diperlukan identifikasi variasi genetik pada ikan tersebut melalui analisis keragaman dan kekerabatan sebagai upaya pemuliaan ikan patin dalam mencegah kemunduran genetik akibat silang dalam.

## Bahan dan metode

### *Ikan uji*

Pengambilan jenis-jenis ikan patin sebagai sampel uji Balai Pengembangan Budi daya Air Tawar (BPBAT) Cijengkol untuk patin siam (*P. hypophthalmus*), pembudidaya ikan patin jambal (*P. jambal*) di Cirata dan patin *pasupati* (*Pangasius* sp.) di Subang, karamba jaring apung (KJA) Waduk Cirata untuk patin siam, serta toko ikan hias Jakarta untuk patin *genghis khan* (*Pangasius sanitwongsei*) dan *giant mekong catfish* (*Pangasianodon gigas*). Secara garis besar deskripsi morfologi kelima jenis patin diuraikan di bawah.

### *Patin siam (Pangasius hypophthalmus)*

Patin siam (Gambar 1) merupakan jenis patin yang umum dan banyak dibudidayakan di Indonesia (Mahyuddin 2010). Patin siam mulai dipijahkan di Indonesia pada tahun 1980 dan pada tahun 1990 budi daya patin mulai berkembang pesat di Jawa Barat, Lampung, Sumatera bagian Selatan, dan Kalimantan. Ikan ini sering juga disebut sebagai patin bangkok atau lele bangkok karena berasal dari Bangkok (Khairuman & Amri 2010).



Gambar 1. Patin siam (*Pangasius hypophthalmus*)

Bentuk tubuh patin siam yang menyerupai patin lokal (*P. jambal*) membuat patin siam dapat diterima dengan baik oleh masyarakat Indonesia dengan ukuran tubuh lebih gemuk. Seluruh tubuhnya didominasi warna putih keperakan dengan sirip berwarna merah ketika dewasa. Kepala patin relatif kecil dengan mulut terletak di ujung kepala agak di sebelah bawah. Hal ini merupakan ciri khas golongan *catfish*. Tepat di sudut mulutnya terdapat dua pasang kumis pendek yang berfungsi sebagai peraba.

*Patin jambal (Pangasius djambal* Bleeker)

Patin jambal merupakan salah satu jenis ikan air tawar asli Indonesia. Indukannya diambil dari alam yang kemudian didomestikasi Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBAT) Sukamandi pada tahun 1997.

Penyebaran geografis patin jambal (Gambar 2) cukup luas, yakni hampir di seluruh wilayah Indonesia. Selain itu, secara alami ikan ini banyak ditemukan di sungai besar di Sumatera (Way Rarem, Musi, Batanghari, dan Indragiri) dan di Jawa (Sungai Brantas dan Bengawan Solo). Populasi ikan ini juga terdapat sungai besar di Kalimantan, seperti Sungai Kayan, Berau, Mahakam, Barito, Kahayan, dan Kapuas. Patin jambal mempunyai daging putih (*white meat*) dan tidak berserat sehingga memiliki syarat untuk komoditas ekspor.

Sirip punggung patin jambal memiliki sebuah jari-jari keras yang berubah menjadi patil yang bergerigi dan besar di sebelah belakangnya. Sementara itu, jari-jari lunak sirip punggung terdapat enam atau tujuh buah. Punggungnya berpuncuk (terdapat sirip lemak yang berukuran kecil sekali). Sirip ekor berbentuk huruf V (tidak membentuk cagak). Sirip dubur terdiri dari 30-33 jari-jari lunak, sedangkan sirip perutnya memiliki enam jari-jari lunak. Sirip dada memiliki 12-13 jari-jari lunak dan sebuah jari-jari keras yang berubah menjadi patil (Susanto & Amri 2005). Bentuk kepala patin jambal pipih dan lebih panjang dibanding patin siam maupun patin *pasupati*. Corak warna sirip-siripnya berwarna hitam, dan warna tubuh hitam keperakan dengan ukuran mata lebih besar dibanding patin siam.

*Patin pasupati (Pangasius sp.)*

Patin pasupati adalah singkatan "*patin super harapan pertiwi*" (Gambar 3) yang merupakan jenis ikan patin baru dan asli dari Indonesia. Patin jenis ini dihasilkan dari persilangan antara patin siam dan patin jambal yang diproduksi oleh Loka Riset Pemuliaan dan Teknologi Budidaya Perikanan Air Tawar (LRPTBAT) Sukamandi, Subang, Jawa Barat pada tahun 2006.

Ciri-ciri morfologi ketiga patin konsumsi diatas tersebut agak mirip satu sama lain, dan ketiganya memiliki patil pada sirip punggung dan sirip dada. Bentuk mata patin pasupati sedikit lebih besar dibanding patin siam. Lubang hidung relatif membesar, mulut subterminal relatif kecil dan melebar ke samping. Jarak antara ujung moncong dengan tepi mata lebih pendek dibanding patin jambal. Sirip ekor membentuk cagak dan bentuknya simetris mirip dengan sirip ekor patin siam.



Gambar 2. Patin jambal (*Pangasius djambal* Bleeker)



Gambar 3. Patin pasupati (*Pangasius* sp.)

*Patin Genghis Khan (Pangasius sanitwongsei)*

Patin Genghis Khan (Gambar 4) merupakan patin yang populer sebagai ikan hias karena morfologinya yang mirip dengan ikan hiu, sehingga dikenal dengan nama hiu air tawar atau ikan hiu yang bewarna-warni (*iridescent shark*). Ikan ini memiliki sirip punggung khas yang tegak memanjang seperti ikan hiu. *Pangasius sanitwongsei* memiliki karakter bentuk tubuh yang berbeda seperti halnya genus *Pangasius* pada umumnya dengan bentuk tubuh memanjang dan sirip-siripnya panjang serta tegak (IUCN 2009).

*Giant Mekong Catfish (Pangasianodon gigas)*

*Pangasianodon gigas* (Gambar 5) merupakan salah satu jenis *catfish* raksasa berasal dari sungai yang dapat mencapai panjang 3 meter (WWF 1996). Mata terletak di bawah mulut bagian atas, dan ukuran mata mirip dengan patin siam. Sirip ekor berbentuk V, hampir mirip bentuk ekor patin siam. Bentuk kepalanya agak mendekati bentuk kepala ikan patin siam.



Gambar 4. Patin Genghis Khan (*Pangasius sanitwongsei*)



Gambar 5. Giant Mekong Catfish (*Pangasianodon gigas*)

#### Pengambilan sampel dan isolasi DNA

Sampel yang digunakan adalah bagian sirip ekor ikan patin berasal dari lokasi yang telah disebutkan di atas. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam botol plastik yang telah ditambahkan larutan preservasi dengan komposisi campuran alkohol 96% dan gliserol (4 : 1).

Sirip ikan patin kemudian diisolasi menggunakan *wizard® genomic purification kit* (Promega). Sampel sirip ditimbang dan dimasukkan dalam tabung *eppendorf* 1,5 ml lalu digerus menggunakan sumpit plastik dan ditambahkan *nucleic lysis solution* sebanyak 300  $\mu$ l. Kemudian sampel tersebut diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,5  $\mu$ l *RNase solution* kedalam sampel lalu di *pipetting up-down* kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit dan dikeringkan. Langkah berikutnya menambahkan 100  $\mu$ l *protein precipitation solution* kedalam sampel kemudian sampel di *vortex* dan didinginkan pada es selama 5 menit. Tahap berikutnya disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Setelah terbentuk endapan pada dasar mikrotube, lalu diambil supernatan yang ada pada bagian atas tube lalu dipindahkan ke tube *eppendorf* baru, dan ditambahkan 300  $\mu$ l isopropanol pada suhu ruang. Selanjutnya disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Supernatan yang berada di bagian atas tube dibuang, kemudian dicampurkan 300  $\mu$ l ethanol 70% pada suhu ruang, lalu disentrifugasi lagi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Ethanol dibuang, dan pellet DNA yang terikat pada dasar tube dikeringkan selama 15 menit dengan cara tube *eppendorf* dibalikkan di atas *tissue* yang kering. Pellet yang ada kemudian direhidrasi dengan ditambahkan 50  $\mu$ l *rehydration solution*, kemudian diinkubasi selama 1 jam dalam *waterbath* dalam suhu 65°C, larutan yang dihasilkan adalah larutan yang telah berisi DNA sampel.

Kuantitas dan kualitas DNA sampel sebagai *template* yang digunakan primer perlu diukur untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. Rumus untuk penghitungan konsentrasi DNA (Barbas *et al.* 2001) sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA (ng/}\mu\text{l)} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{OD}_{260} \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\text{Faktor pengenceran} = 50 \text{ kali}$$

Rasio perbandingan antara nilai pembacaan spektrofotometri DNA sampel pada  $A_{260\text{nm}}$  dan  $A_{280\text{nm}}$  menentukan tingkat kemurnian DNA. Kualitas isolat DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8 - 2,0.

*Optimasi PCR*

Optimasi PCR diperlukan mengingat sekuen primer RAPD menempel secara acak di sepanjang DNA genom ikan sampel sehingga hanya sekuen primer yang komplementer dengan sekuen DNA genom tersebut yang menghasilkan amplikon fragmen DNA.

Menurut Champasri *et al.* (2008), primer yang digunakan untuk menganalisis variasi genetik populasi *Pangasius bocourti* di Sungai Mekong adalah primer OPA dari *Operon Technology* yang menghasilkan fragmen DNA polimorfik yaitu OPA-2, OPA-7, dan OPA-9. Primer OPA inilah yang kemudian digunakan pada sampel uji patin jambal (*P. djambal Bleeker*), patin siam (*P. hypophthalmus*), patin pasupati (*Pangasius sp.*), patin genghis khan (*P. sanitwongsei*), dan patin giant mekong (*Pangasianodon gigas*). Selain primer di atas, juga digunakan primer OPA-2 dan OPA-3 (Muharam, 2012) yang menggunakan sampel patin hias dan menghasilkan fragmen DNA polimorfik. Dengan demikian keempat primer ini dijadikan sebagai acuan untuk identifikasi polimorfisme pada penelitian ikan patin.

*Amplifikasi DNA dengan teknik RAPD-PCR*

Amplifikasi DNA genom ikan patin dilakukan dengan menggunakan metode *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) untuk melihat suatu penanda polimorfisme dan suatu kekerabatan pada makhluk hidup. Amplifikasi ini menggunakan 4 macam primer dari *Operon Technology* yaitu OPA-2, OPA-3, OPA-7, dan OPA-9. Setiap sampel direaksikan dengan *go taq® green master mix 2X* (Promega) 12,5 µl, primer RAPD 1,25 µl, 2 µl DNA sampel sebagai *template* dan 9,25 µl *Nuclease Free Water* steril sampai dengan volume total reaksi keseluruhan 25 µl. Sekuen primer RAPD yang digunakan untuk reaksi PCR disajikan pada Tabel 1.

Pengaturan suhu, waktu dan jumlah siklus yang dibutuhkan dalam reaksi PCR untuk setiap sampel patin uji disajikan dalam Tabel 2 di bawah.

Tabel 1. Sekuen primer OPA

Primer	Urutan Basa Nukleotida
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'

Tabel 2. Program RAPD-PCR Primer OPA (Muharam 2012)

Proses	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus
Pra denaturasi	94	2	1 x
Denaturasi	94	1	45 x
<i>Annealing</i>	36	1	
Ekstensi	72	2	
Ekstensi akhir	72	10	1 x
<i>Hold</i>	4	10	

### Elektroforesis

Produk PCR selanjutnya dianalisis menggunakan elektroforesis dengan menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1,4%. Gel agarose kemudian direndam akua-des steril yang telah ditambahkan *Ethidium Bromide* (EtBr). Visualisasi DNA dilakukan dengan *uv transilluminator* sehingga DNA berpendar dan dapat dilihat secara kasat mata, kemudian didokumentasikan dengan kamera digital.

### Analisis Polimorfisme

Analisis keragaman genetik (polimorfisme) pada sampel ikan patin uji dilakukan dengan meng-*input* ada tidaknya fragmen DNA hasil amplifikasi yang diterjemahkan dalam data numerik. Amplikon DNA yang muncul diterjemahkan ke dalam angka satu (1) dan yang tidak muncul diterjemahkan ke angka nol (0). Fragmen DNA yang hanya teramplifikasi pada suatu sampel patin dan tidak teramplifikasi pada sampel patin lainnya diinterpretasikan sebagai fragmen polimorfik yang menunjukkan adanya variasi genetik dan perbedaan jarak kekerabatan genetik suatu organisme (Liu & Cordes 2004).

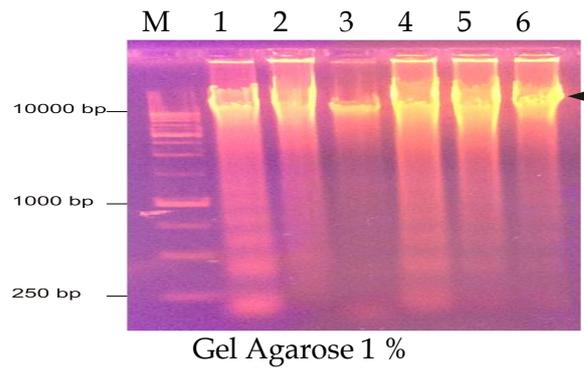
Hubungan genetik sampel DNA patin uji ditentukan dengan menghitung indeks kesamaannya berdasarkan data numerik amplikon yang teramplifikasi. Indeks kesamaan ini dihitung dengan menggunakan program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) pc. Kekerabatan diantara ikan patin dianalisis dengan menggunakan jarak genetik berdasarkan program UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) modifikasi Alam *et al.* (2006) dari software NTSYS. Data yang dihasilkan dari penggunaan program tersebut berupa konstruksi pohon filogeni yang disajikan dalam bentuk dendrogram.

## Hasil dan pembahasan

### Isolasi DNA

Isolasi atau ekstraksi DNA yang dilakukan pada sampel-sampel uji (potongan kecil sirip ikan patin) dimaksudkan untuk memperoleh pelet DNA yang digunakan sebagai *template*. Proses ekstraksi ini mencakup proses lisis jaringan, proses pemisahan dan pelarutan organel-organel sel dengan inti sel, proses pengendapan sisa-sisa yang terekstrak dan pencucian pelet DNA dari debris (sisa hasil ekstraksi) sehingga diperoleh hanya pelet DNA (Sano *et al.* 2005). Keberadaan hasil isolasi DNA genomik ikan patin uji dapat ditunjukkan dari hasil elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 6).

Ketebalan pita DNA dari sampel sirip ikan patin siam Cijengkol, patin pasupati Sukamandi, patin siam Sukamandi, patin jambal Cirata, *P. gigas* dan patin genghis khan (sumur 1 - 6) pada Gambar 1 menunjukkan kualitas sampel DNA yang layak digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk primer. Menurut Promega (2007), kualitas DNA yang baik memiliki konsentrasi antara 1-10 µg/µl. Hasil pengukuran konsentrasi DNA genomik ikan patin uji dengan spektrofotometer *UV vis* berkisar antara 3,60 - 8,03 µg/µl (Tabel 3). Dengan demikian isolat DNA yang diperoleh memenuhi syarat untuk dijadikan sebagai cetakan. Kualitas genomik sampel patin sebagai cetakan DNA untuk pengerjaan PCR (Tabel 3) menghasilkan nilai kemurnian cukup tinggi dengan rasio Abs 260nm/280nm sekitar 1,6-1,9 (Barbas *et al.* 2001).



Gambar 6. DNA genomik ikan patin (◄). M = Marker DNA Ladder 1 kb. 1= patin siam asal Cijengkol, 2= patin pasupati asal Subang, 3= patin siam asal Subang, 4= patin jambal asal Cirata, 5= *Pangasionodon gigas*, 6= patin genghis khan

Tabel 3. Konsentrasi DNA genom patin

Sampel	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Rasio Abs 260nm/280nm
Patin siam Cijengkol	4,80	1,811
Patin pasupati Sukamandi	5,95	1,597
Patin siam Sukamandi	3,60	1,823
Patin jambal Cirata	5,83	1,849
<i>Pangasionodon gigas</i>	8,03	1,783
Patin <i>genghis khan</i>	5,93	1,866

#### Produk PCR dengan primer RAPD

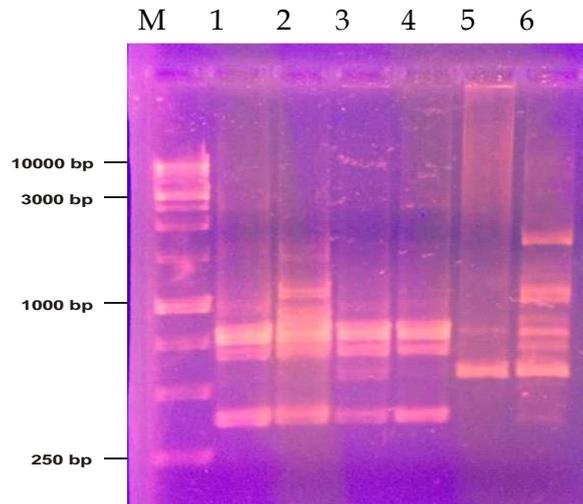
Hasil amplifikasi dengan primer OPA-02, OPA-03, OPA-07 dan OPA-09 pada DNA patin sampel uji memberikan ukuran dan jumlah fragmen DNA yang bervariasi, bergantung pada komplementarisasi sekuens nukleotida primer dengan nukleotida DNA genomik patin.

Fragmen-fragmen DNA sampel patin uji yang teramplifikasi menggunakan empat macam primer OPA dianalisis keberadaan fragmen polimorfiknya dan kecocokan primer dengan DNA *template* patin uji melalui optimasi primer tersebut. Masing-masing produk PCR disajikan pada Gambar 7 (primer OPA-02), Gambar 8 (primer OPA-03), Gambar 9 (primer OPA-07) dan Gambar 10 (primer OPA-09).

Berdasarkan hasil Gambar 7, primer OPA-02 dapat mengamplifikasi fragmen-fragmen DNA setiap sampel patin uji (*Pangasius hypophthalmus*, *Pangasius* sp., *Pangasius jambal*, *Pangasionodon gigas*, dan *Pangasius sanitwongsei*), yang menunjukkan bahwa primer tersebut cocok digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik ikan patin. Variasi amplicon fragmen DNA pada patin pasupati sebagai ikan hibrid dari persilangan patin siam dengan patin jambal lebih banyak dibandingkan dengan hasil amplifikasi pada patin siam dan patin jambal. Hal ini membuktikan bahwa primer OPA-02 merupakan primer pilihan dalam menunjukkan variasi pasangan alel yang terbentuk dari rekombinasi genotip patin yang berbeda strain dan tecermin dari fenotip patin pasupati yang berbeda dengan fenotip patin siam maupun patin jambal. Selain menunjukkan variasi genetik pada patin hibrid, primer tersebut juga dapat memperlihatkan adanya variasi fragmen DNA pada patin siam asal Cijengkol dan asal Sukamandi serta pada *Pangasionodon gigas* dan *Pangasius sanitwongsei*. Dengan demikian primer OPA-02 dapat diguna-

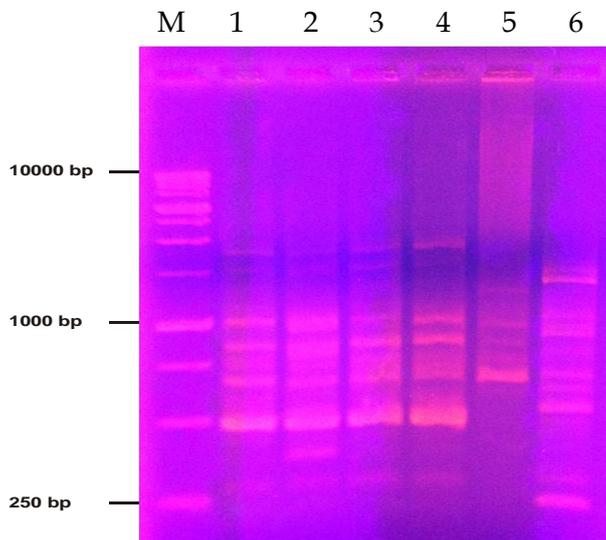
kan sebagai penanda genetik untuk kegiatan seleksi induk baik seleksi tetua maupun seleksi progeni dalam upaya mengeksploitasi potensi keunggulan genetik.

Disamping oleh primer OPA-02, keragaman genetik pada sampel patin uji juga terdeteksi oleh primer OPA-03 (Gambar 8). Hasil ini menunjukkan bahwa primer OPA-03 dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk seleksi keragaman genetik ikan patin.



Gel agarose 1,4 %

Gambar 7. Produk PCR primer OPA-02. M = marker DNA Ladder 1 kb. 1= patin siam asal Cijengkol, 2= patin pasupati asal Subang, 3= patin siam asal Subang, 4= patin jam-bal asal Cirata, 5= *Pangasionodon gigas*, 6= patin genghis khan

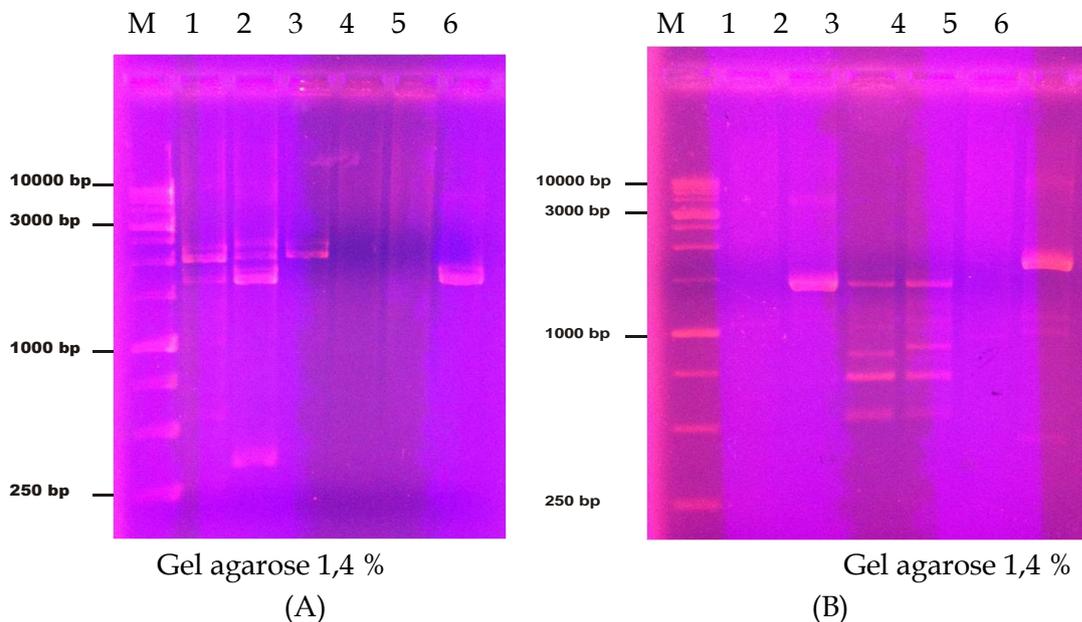


Gel agarose 1,4 %

Gambar 8. Produk PCR primer OPA-03. M = marker DNA Ladder 1 kb. 1= patin siam asal Cijengkol, 2= patin pasupati asal Subang, 3= patin siam asal Subang, 4= patin jam-bal asal Cirata, 5= *Pangasionodon gigas*, 6= patin genghis khan

Hasil amplifikasi DNA genomik patin siam Cijengkol, patin pasupati Subang, patin siam Subang, patin jambal Cirata, patin *giant mekong catfish* dan patin *genghis khan* dengan primer OPA-03 (Gambar 8), menghasilkan fragmen DNA lebih banyak dibandingkan primer OPA-02 dan menunjukkan perbedaan jumlah dan posisi fragmen DNA pada setiap sampel ikan patin. Profil fragmen DNA patin pasupati berbeda dengan patin siam dan patin jambal, serta dengan patin *giant mekong catfish* maupun patin *genghis khan*. Demikian juga halnya dengan profil fragmen DNA patin siam dengan patin jambal dan patin *giant mekong catfish* sampel DNA patin uji oleh primer OPA-03 tersebut, variasi dan kedekatan kekerabatan genetik diantara patin dapat dideteksi, menunjukkan primer OPA-03 cocok digunakan dalam menentukan potensi genetik induk.

Khusus untuk primer OPA-07 dan OPA-09, tidak semua sampel DNA patin dapat diamplifikasi kedua primer tersebut. Primer OPA-07 hanya dapat mengamplifikasi fragmen DNA sampel patin siam Cijengkol, patin pasupati Subang, patin siam Subang dan patin *genghis khan* dengan jumlah fragmen lebih sedikit, sedangkan patin jambal Cirata dan patin *giant mekong catfish* tidak teramplifikasi (Gambar 4a). Sebaliknya primer OPA-09 hanya mengamplifikasi fragmen DNA sampel patin pasupati Subang, patin siam Subang, patin jambal Cirata dan patin *genghis khan*, sementara sampel DNA patin siam Cijengkol dan patin *giant mekong catfish* tidak teramplifikasi (Gambar 4b). Hal ini menunjukkan bahwa baik primer OPA-07 dan OPA-09 tidak cocok digunakan dalam menganalisis kekerabatan genetik diantara lima jenis patin tersebut, mengingat fragmen DNA sampel patin jambal Cirata, patin *giant mekong catfish* dan patin siam Cijengkol tidak teramplifikasi oleh kedua primer tersebut.



Gambar 9. (A) Produk PCR primer OPA-07 dan (B) produk PCR primer OPA-09. M = marker DNA Ladder 1 kb. 1= patin siam asal Cijengkol, 2= patin pasupati asal Subang, 3= patin siam asal Subang, 4= patin jambal asal Cirata, 5= *Pangasionodon gigas*, 6= patin genghis khan

Variasi alel yang ditunjukkan dengan keberadaan fragmen yang diamplifikasi oleh primer OPA-02 dan OPA-03 dan menghasilkan fragmen polimorfik, membuktikan bahwa primer tersebut merupakan marker untuk identifikasi perbedaan spesies dan analisis filogenetik, khususnya identifikasi subspecies ikan untuk menyatakan karakter spesifik suatu spesies (Bardacki & Skibinski 1994 dan Danish *et al.* 2012). Primer OPA-02 lebih sensitif dibandingkan OPA-03 dalam mendeteksi keberadaan fragmen polimorfik untuk menginterpretasikan patin pasupati sebagai ikan hibrid, sebaliknya primer OPA-03 mendeteksi jumlah fragmen polimorfik pada *giant mekong catfish* (*Pangasionodon gigas*) dan *genghis khan* (*Pangasius sanitwongsei*) lebih banyak dibandingkan OPA-02 (Gambar 7 dan 8). Liu & Cordes (2004) juga menyatakan bahwa marker RAPD ini dapat menginterpretasikan variasi alel dalam populasi yang sama sebagai identifikasi ikan hibrid. Berdasarkan hasil tersebut, untuk analisis fragmen polimorfik dan kekerabatan genetik kelima patin digunakan data profil ampikon primer OPA-02 dan OPA-03.

#### Analisis fragmen polimorfik

Penanda molekuler DNA pada dasarnya merupakan segmen DNA spesifik yang dapat menunjukkan fragmen polimorfisme yang berbeda pada masing-masing individu dalam satu spesies. Fragmen polimorfik adalah gambaran pita DNA yang muncul pada ukuran tertentu, tetapi pada sampel lain tidak ditemukan pita DNA pada ukuran tersebut. Pada Tabel 4 disajikan profil fragmen polimorfik yang dihasilkan oleh primer OPA-02 dan OPA-03 untuk mengetahui variasi alel pada setiap patin uji yang terkait dengan variasi fenotip pada ikan tersebut.

Jumlah fragmen polimorfik pada sampel DNA patin pasupati sebanyak 2 fragmen, pada sampel DNA patin jambal hanya 1 fragmen dan 3 fragmen pada sampel DNA patin *genghis khan* (Tabel 4) yang mencerminkan adanya variasi fenotip (perbeda-

Tabel 4. Fragmen polimorfik yang dihasilkan primer OPA-02

Ukuran fragmen	patin siam Cijengkol	patin pasupati	patin siam Sukamandi	patin jambal	<i>giant mekong catfish</i>	<i>genghis khan</i>
1731 bp						---
1650 bp						---
1500 bp		---				
1300 bp						---
1100 bp		---				---
1000 bp	---	---	---	---		---
950 bp	---	---	---	---		---
850 bp	---	---	---	---	---	---
800 bp	---	---	---	---	---	---
750 bp	---	---	---	---		---
700 bp				---	---	---
650 bp				---		
500 bp		---				
400 bp	---	---	---	---		---

--- = fragmen monomorfik

---\* = fragmen polimorfik

an ukuran mata, bentuk kepala, bentuk sirip, dan warna tubuh) pada kelima jenis patin tersebut. Marka molekuler yang sensitif akan memberikan variasi alel yang berkaitan dengan fenotip dominan mengikuti hukum Mendel untuk karakter spesifik suatu spesies yang bermanfaat dalam program *selective breeding* dan kemudahan seleksi genetik induk ikan (Danish *et al.* 2012). Semakin tinggi jumlah alel polimorfik yang terkandung dalam DNA ikan, eksploitasi fenotip kuantitatif yang menguntungkan semakin mudah untuk tujuan seleksi. Berdasar Tabel 4, ikan patin *genghis khan* dan patin pasupati masih memungkinkan untuk disilangkan diantara spesies yang berbeda, oleh karena jumlah fragmen polimorfik lebih tinggi dibandingkan ikan patin siam dan patin jambal. Profil fragmen polimorfik yang dihasilkan oleh primer OPA-03 disajikan dalam Tabel 5.

Fragmen polimorfik yang dihasilkan primer OPA-03, berbeda dengan primer OPA-02, di mana jumlah fragmen pada sampel DNA ikan patin *giant mekong catfish* sebanyak 2, pada sampel DNA ikan patin pasupati hanya 1, pada sampel DNA ikan patin jambal juga sebanyak 1 dan pada ikan patin *genghis khan* sebanyak 3 (Tabel 5). Baik primer OPA-02 dan OPA-03 konsisten dalam mendeteksi jumlah fragmen polimorfik pada DNA ikan patin jambal dan ikan patin *genghis khan* masing-masing sebanyak 1 dan 3. Keberadaan fragmen monomorfik pada kelima jenis ikan patin baik yang dihasilkan oleh primer OPA-02 dan OPA-03, mengindikasikan bahwa genetik ikan masih sekera-bat, sedangkan fragmen polimorfik menunjukkan kekerabatan yang agak jauh.

Tabel 5. Amplifikasi fragmen polimorfik primer OPA-03

Ukuran fragmen	patin siam Cijengkol	patin pasupati	patin siam Sukamandi	patin jambal	<i>giant mekong catfish</i>	<i>genghis khan</i>
1861 bp	---	---	---	---		
1610 bp						---
1500 bp						---
1450 bp					---	
1300 bp				---		
1000 bp	---	---	---	---	---	---
975 bp	---	---	---	---	---	
850 bp						
900 bp					---	
850 bp	---	---	---	---	---	
750 bp	---	---	---	---	---	
700 bp	---	---	---			---
650 bp	---	---	---	---		
600 bp	---	---	---	---		
500 bp	---	---	---	---		
350 bp		---				
300 bp	---	---	---	---		
250bp						---

--- = fragmen monomorfik

---\* = fragmen polimorfik

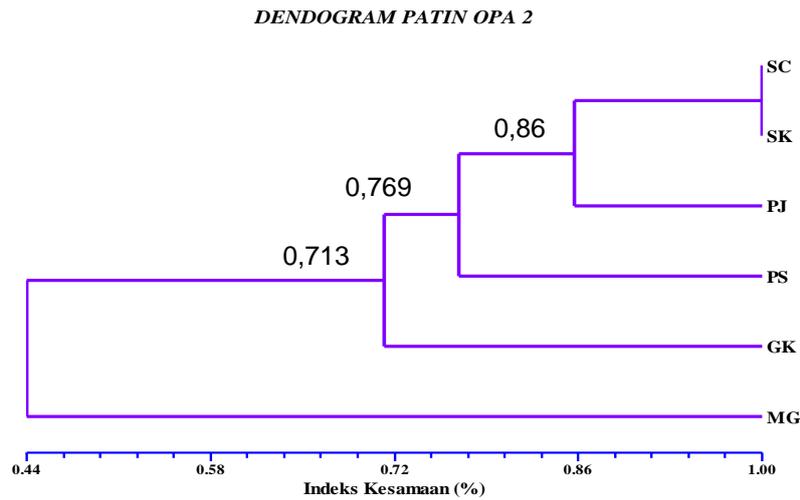
*Kekerabatan genetik ikan patin*

Kelompok kekerabatan genetik yang didapatkan dari hasil pengolahan data NTSYS berdasar primer OPA-02 diperoleh bahwa ikan patin dikelompokkan menjadi 5 yaitu kerabat ikan patin siam dengan patin jambal, kerabat patin jambal, kerabat patin pasupati, kerabat patin *genghis khan* dan kerabat patin *mekong giant catfish* (Gambar 10). Ikan patin siam asal Cijengkol dan Sukamandi identik karena memiliki indeks kesamaan tinggi (hampir 100%), sebaliknya hubungan kedekatan genetik ikan patin jambal dengan patin siam Cijengkol maupun Sukamandi sebesar 86%, yang mengindikasikan sebagian besar ciri-ciri morfologi ketiga patin mirip dengan sedikit perbedaan pada warna tubuh, ukuran mata dan bentuk sirip ekor. Fragmen DNA yang teramplifikasi primer OPA-02 juga menunjukkan kemiripan tinggi antara patin siam Cijengkol, Sukamandi dan patin jambal (Gambar 2). Patin pasupati sebagai ikan hibrid keturunan patin siam dan patin jambal, mewarisi sifat-sifat genetik baik sifat patin siam dan patin jambal sebagai *parent*, yang ditunjukkan berdasar fragmen DNA yang teramplifikasi primer OPA-02 (Gambar 2) dengan kedekatan hubungan genetik 76,9 % (Gambar 5). Variasi fenotip (warna tubuh, ukuran mata, bentuk sirip ekor) yang muncul pada patin pasupati sebagai ikan hasil persilangan antara patin siam dan patin jambal terdeteksi oleh primer OPA-02 yang diindikasikan dengan fragmen polimorfik (Tabel 4), menyebabkan sedikit penurunan dalam indeks kesamaan kekerabatan genetik (Gambar 10).

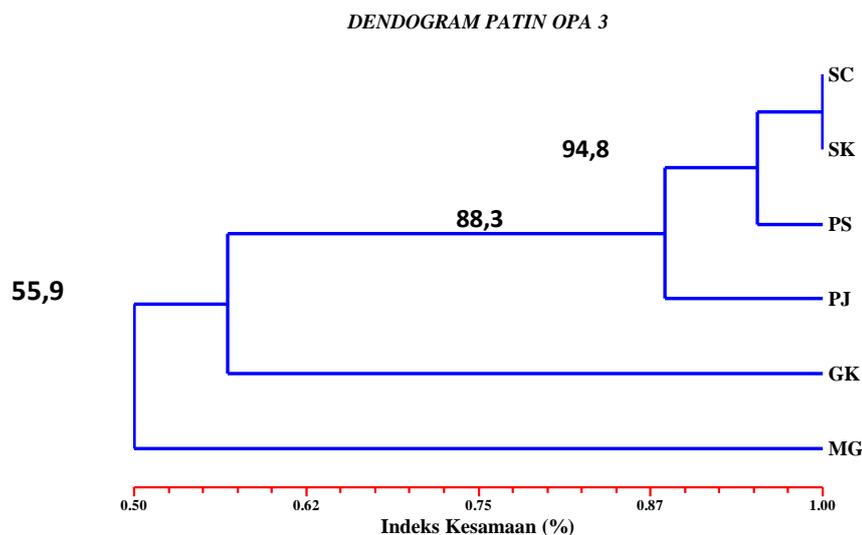
Indeks kesamaan antara patin siam, patin jambal dan patin pasupati dengan patin *genghis khan* sebesar 71,3 % yang menunjukkan kekerabatan genetik tergolong dekat (Gambar 10). Ikan patin *mekong giant catfish* memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dengan keempat jenis patin lainnya (siam, pasupati, jambal, *genghis khan*) ditunjukkan dengan nilai indeks kesamaan 44 % (Gambar 10) yang mengindikasikan ketidakmiripan, dan primer OPA-02 dapat mendeteksi fragmen monomorfik sebanyak 3 (Tabel 4) menguatkan bukti ketidakmiripan genetik patin tersebut. Jumlah kromosom satu spesies bisa sama dengan spesies lain, tetapi komposisi gen-gen yang terkandung berbeda (Ferguson *et al.* 1995). Semakin jauh hubungan kekerabatan suatu organisme, makin besar kemungkinan perbedaan susunan gen yang terkandung dalam kromosomnya.

Interpretasi hubungan kekerabatan patin yang ditunjukkan oleh dendrogram primer OPA-03 (Gambar 11) mirip dendrogram hasil PCR oleh primer OPA-02, di mana ikan patin *genghis khan* memiliki hubungan kekerabatan agak dekat dengan patin jambal, patin pasupati dan patin siam (indeks kesamaan 55,9%) dan sebesar 50% dengan patin *mekong giant catfish*.

Jumlah fragmen polimorfik yang terdeteksi baik oleh primer OPA-02 dan OPA-03 sama (3 fragmen), menunjukkan kedua primer sensitif melacak variasi fenotip pada ikan patin *genghis khan* (Tabel 4 dan 5). Primer OPA-03 dapat mendeteksi fenotip pada ikan patin *mekong giant catfish* yang berbeda dengan fenotip yang ada pada keempat patin tersebut, seperti bentuk tubuh memanjang, sirip tegak seperti ikan hiu (Tabel 5), sebaliknya primer OPA-02 tidak dapat melacak variasi fenotip ikan tersebut (Tabel 4).



Gambar 10. Dendrogram patin dengan primer OPA-02. SC = patin siam Cijengkol, SK = patin siam Subang Karamba, PJ = patin jambal, PS = patin pasupati, GK = patin *genghis khan*, MG = patin *mekong giant catfish*



Gambar 11. Dendrogram patin dengan primer OPA-03. SC = patin siam Cijengkol, SK = patin siam Subang Karamba, PJ = patin jambal, PS = patin pasupati, GK = patin *genghis khan*, MG = patin *mekong giant catfish*

Hasil analisis kekerabatan genetik pada Gambar 10 dan 11 mengindikasikan bahwa primer OPA-03 menyatakan ikan patin *genghis khan* dan *mekong giant catfish* memiliki hubungan genetik agak jauh (indeks kesamaan 55,9%) dengan patin jambal, patin pasupati dan patin siam, dan sebaliknya primer OPA-02 menyatakan hubungan agak dekat (indeks kesamaan 71,3%). Disamping itu, primer OPA-03 hanya mendeteksi 1 fragmen polimorfik pada patin pasupati, sedangkan primer OPA-02 mendeteksi 2 fragmen polimorfik pada ikan tersebut (Tabel 4 dan 5), menunjukkan primer OPA-02 kurang sensitif melacak variasi fenotip patin pasupati. Namun demikian, jumlah fragmen monomorfik yang dihasilkan oleh primer OPA-03 lebih banyak daripada primer OPA-

02, sehingga baik primer OPA-02 dan OPA-03 layak digunakan untuk mendeteksi keragaman genetik kelima jenis patin tersebut.

Danish *et al.* (2012) menyatakan bahwa variasi genetik yang ditunjukkan dengan jumlah fragmen-fragmen DNA spesifik produk RAPD dari hasil persilangan spesies ikan yang berbeda umumnya meningkat, sebagaimana yang telah dibuktikan pada ikan hibrid (ikan lele dumbo, ikan lele Sangkuriang). Berdasar analisis polimorfisme, pada ikan patin pasupati masih memungkinkan untuk diseleksi potensi keunggulannya sebagai induk patin oleh karena keberadaan fragmen polimorfik pada ikan tersebut. Variasi genetik ini diwariskan dari ikan patin jambal, walaupun tidak diperoleh dari ikan patin siam sebagai *parentnya*. Sebaliknya keragaman genetik pada ikan patin *genghis khan* dan *mekong giant catfish* masih tinggi, menunjukkan potensi sebagai induk unggul. Keberadaan variasi genetik induk ikan perlu dipertahankan pada setiap generasi untuk menjaga potensi keunggulan dan menghindari terjadinya *inbreeding* pada keturunan (Liu *et al.*, 1999; Silverstein *et al.* 2004).

### Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa jumlah fragmen polimorfik terbanyak berturut-turut terdapat pada ikan patin *genghis khan*, patin *mekong giant catfish*, patin pasupati dan patin jambal. Hubungan kekerabatan genetik ikan patin siam, patin pasupati, patin jambal tergolong dekat, dan pada ikan patin *mekong giant catfish* serta *patin genghis khan* jauh. Primer OPA-02 dan OPA-03 dapat digunakan untuk analisis variasi fenotip dan kekerabatan genetik ikan patin. Ikan patin siam tidak memiliki fragmen polimorfik (keragaman genetik rendah)

### Persantunan

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim peneliti, yaitu ibu Yeni Mulyani, M.Si dan saudari Afa Soraya S.Pi atas bantuannya dalam pengerjaan penelitian ini.

### Daftar pustaka

- Alam MS, Islam MS, Alam MS. 2006. DNA fingerprinting of the freshwater mud eel (*Monopterus albus*) by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(2): 271 – 278.
- Barbas CF, Button DR, Scott JK, Silverman GJ. 2001. *Quantitation of DNA and RNA. Adapted from "General Procedure", appendix 3.* Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Bardakci F, Skibinski DOF. 1994. Application of RAPD technique in Tilapia fish: species and subspecies identification. *J. Hered.* 73 : 117-123.
- Champasri T, Jiwyam W, Budriang Ch, Charoenwattanasak S. 2010. Genetic variation among populations of pla-mong fish (*Pangasius bocourti* Sauvage 1880) of the Mae Kong River in Northeast Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(8): 395-399.
- Danish M, Singh IJ, Giri P, Singh CP. 2012. Molecular characterization of two populations of catfish *Clarias batrachus* L. using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(7) :14217-14226.

- Ferguson AJ, Taggart AJ, Prodohl PA, Hynes RA. 1995. The application of molecular markers to study and conservation of fish populations with special reference to salmon. *Journal of Fish Biology*, 47: 103-126.
- Imron, Arifin OZ, Subagyo. 2000. Karakterisasi truss morfometrik pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) galur majalaya, rajadanu, wildan, dan sutisna. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan 1999/2000*. Puslitbang Eksplorasi Laut dan Perikanan. Departemen Eksplorasi Laut dan Perikanan. Jakarta.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2009. Amazing Species: Giant Pangasius. IUCN Red List of Threatened Species.
- Khairuman. 2007. *Budi daya patin super*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Khairuman, Amri K. 2010. *Petunjuk praktis budi daya patin di kolam terpal*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Koh TL, Khoo G, Qi Fan L, Phang VPE. 1999. Genetic diversity among wild forms and cultivated varieties of discus (*Symphysodon* spp.) as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Aquaculture*, 173: 485-497
- Liu ZJ, Li P, Arque BJ, Dunham RA. 1999. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174 : 59-68.
- Liu ZJ, Cordes JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Mahyuddin, K. 2010. *Panduan lengkap agribisnis patin*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Muharam EG. 2012. Analisis kekerabatan ikan mas koi (*Cyprinus carpio koi*) dan ikan mas majalaya (*Cyprinus carpio carpio*) menggunakan metoda RAPD. *Skripsi*. Program Studi Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjadjaran.
- Nursida NF. 2011. Polimorfisme ikan kerapu macan (*Ephinephelus fuscoguttatus* Forsskal) yang tahan bakteri *Vibrio alginolyticus* dan toleran salinitas rendah serta salinitas tinggi. *Skripsi*. Program Studi Budi daya Perairan. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Promega Corporation. 2007. Wizard Genomic DNA Purification Kit Protocol.
- Sano N, Morkwake M, Hondo R, Sano T. 1993. Herpesvirus cyprini: a search for viral genome in infected fish. *J. Fish Dish.* 16 : 495-499.
- Silverstein JT, Rexroad CE, King TL. 2004. Genetic variation measured by microsatellite among three strains of domesticated rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Res.* 35: 40-48.
- Susanto H, Amri K. 2005. *Budidaya ikan patin*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- WWF (World Wide Fund For Nature). 1996. *River of giants, giant fish of the Mekong*. Vientiane, Lao PDR.