

Penentuan tingkat ploidi pada poliploid patin siam *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 hasil manipulasi genetik berdasarkan jumlah nukleolus per sel

[Ploidy level determination in genetically modified polyploid striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 based on the number of nucleoli per cell]

Muhammad Sami Daryanto¹, Odang Carman², Dinar Tri Soelistyowati², Rahman²

¹Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Budidaya Perairan, FPIK-IPB
Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

Diterima: 9 September 2018; Disetujui: 26 Desember 2018

Abstrak

Penentuan variasi jumlah maksimum nukleolus per sel pada individu diploid dan tetraploid patin siam *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 dilakukan dalam upaya verifikasi ketepatan penghitungan nukleolus sebagai metode tidak langsung dalam identifikasi ikan poliploid. Penelitian ini bertujuan menentukan tingkat ploidi ikan patin siam berdasarkan jumlah maksimum nukleolus per sel. Diploid patin siam dihasilkan melalui fertilisasi buatan antara telur dan sperma tanpa kejutan suhu sedangkan tetraploid patin siam dihasilkan melalui fertilisasi antara telur dan sperma serta di induksi menggunakan kejutan suhu 4°C dengan durasi kejutan 25 menit pada umur zigot 28 menit setelah fertilisasi sesaat sebelum mitosis I. Persentase penetasan kelompok perlakuan diploid 81,35±0,73% dan kelompok perlakuan tetraploid 3,39±1,78%. Sintasan kelompok perlakuan diploid 88,67±5,25% dan kelompok tetraploid 83,33±5,73% selama 15 hari pemeliharaan. Frekuensi satu, dua, tiga dan empat nukleoli per sel dihitung berdasarkan pengamatan 450-550 sel setiap individu yang diamati. Sel individu diploid memiliki satu dan maksimum dua nukleoli per sel, sedangkan individu tetraploid memiliki satu, dua, tiga, dan maksimum empat nukleoli per sel. Anomali muncul melalui pewarnaan perak nitrat pada jumlah maksimum tiga nukleoli per sel menunjukkan individu tersebut tetraploid yang diverifikasi menggunakan metode penghitungan kromosom. Penentuan ploidi pada ikan patin siam menggunakan penghitungan jumlah nukleolus per sel memiliki potensi dalam identifikasi secara cepat.

Kata penting: nukleolus, patin siam, poliploid, tingkat ploidi.

Abstract

The variation in the maximum number of nucleoli per cell in diploid and tetraploid striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878 in attempts to verify the validity of nucleoli counting as an indirect method for polyploidy identification in fish. The aim of this research was to determine ploidy level of striped catfish based on the maximum number of nucleoli per cell. The diploid striped catfish was produced by fertilizing eggs without thermal-shock and tetraploid fish was obtained by fertilizing eggs and applying thermal-shock induction with 4°C for 25 minutes at zygotic age 28 minutes after fertilization prior to the first cleavage stage of zygote. The hatching rate of diploid group and tetraploid group were 81.35±0.73% and 3.39±1.78% and survival rate during the 15 days rearing were 88.67±5.25% and 83.33±5.73%, respectively. The frequency of one, two, three, and four nucleoli per cell were counted based on each sample observation of 450-550 cells. Cell of individual diploid had one nucleoli and maximum two nucleoli per cell, while tetraploid had one, two, three, and maximum four nucleoli per cell. Anomaly in the silver-stained appearance at the maximum number of three nucleoli per cell indicated tetraploid individuals as verified by chromosome counting method. Ploidy level determination of striped catfish using the number of nucleoli per cell has a potential for rapid identification.

Keywords: ploidy level, polyploidy, striped catfish, nucleoli

Pendahuluan

Manipulasi set kromosom, salah satunya poliploidisasi merupakan teknik rekayasa genetik yang terbukti efektif dan penerapannya se-

derhana dalam memperbaiki mutu genetik ikan patin siam. Metode poliploidisasi telah umum dilakukan dalam berbagai percobaan bidang akuakultur tetapi tidak menjamin 100% individu poliploid terbentuk sehingga memerlukan metode yang sederhana, cepat, dan akurat untuk pe-

✉ Penulis korespondensi

Alamat surel: samidaryanto@gmail.com

mentuan tingkat ploidi. Namun metode yang dapat diandalkan untuk mengidentifikasi poliploid dengan cepat masih belum tersedia. Kombinasi beberapa teknik sederhana seperti penghitungan kromosom dan penghitungan jumlah nukleolus dapat membantu dalam kecepatan, ketepatan, mudah dan relatif lebih murah serta dapat diandalkan dalam manipulasi genom (Pradeep *et al.* 2014). Beberapa metode yang telah diterapkan dalam penentuan tingkat ploidi antara lain: *karyotyping* atau penghitungan jumlah kromosom, penghitungan jumlah nukleolus, pengukuran inti sel darah merah, penghitungan ukuran inti sel, penentuan kandungan DNA menggunakan *flow cytometry* dan mikrosatelit (Bai *et al.* 2011). Salah satu metode termudah dan tercepat dalam penentuan tingkat ploidi yakni penentuan jumlah kandungan DNA menggunakan *flow cytometry* dan mikrosatelit, tetapi memiliki kelemahan yakni membutuhkan biaya peralatan yang besar (Mukti 2017). Walaupun pengukuran inti sel darah merah banyak digunakan seperti yang dilaporkan Caterina *et al.* (2014), masih memiliki kelemahan yakni ukuran inti sel darah merah ikan triploid tidak selalu 1,5 kali lebih besar jika dibandingkan dengan diploid dan masih bergantung pada anti koagulan yang digunakan untuk mengoleksi sampel darah sehingga membutuhkan waktu dalam persiapan sampel dan pembuatan preparat. Alternatif lain dalam penentuan tingkat ploidi yakni penghitungan jumlah kromosom yang merupakan metode langsung dan paling akurat dalam identifikasi tingkat ploidi karena mencerminkan set kromosom. Metode ini diyakini membutuhkan waktu yang lebih lama, biaya yang relatif mahal, dan tingkat keahlian tinggi yang menentukan keberhasilannya (kelembaban, ketinggian penetesan suspensi, dan teknik dalam pengeringan preparat) se-

hingga tidak praktis dalam penelitian lapangan (Kim *et al.* 2017).

Berdasarkan metode-metode di atas, penghitungan jumlah nukleolus pada sel tubuh merupakan metode tidak langsung dalam identifikasi tingkat ploidi secara efektif dan efisien. Jumlah nukleolus meningkat pada beberapa kondisi fisiologis (sebagai contoh pertumbuhan oosit) tanpa diiringi peningkatan set kromosom (Carman *et al.* 1992). Pada *interfase* sel somatik, terdapat hubungan antara jumlah nukleolus yang terlihat dengan jumlah set kromosom. Sel tumbuhan atau hewan biasanya memiliki jumlah nukleolus yang tetap sehingga tingkat ploidi berbagai spesies tersebut dapat dengan mudah diperkirakan dengan menghitung jumlah nukleolusnya. Hubungan antara jumlah nukleolus dan jumlah set kromosom telah digunakan pada berbagai spesies ikan seperti *Oreochromis niloticus* (Mukti 2016), *Rhodeus uyeckii* (Gill *et al.* 2016), dan *Salvelinus fontinalis* (Jewsiewicka *et al.* 2015). Visualisasi nukleolus menggunakan pewarnaan perak nitrat sangat mudah diterapkan karena dapat digunakan pada ikan berumur muda, menggunakan berbagai jaringan spesimen tubuh dalam jumlah sedikit, dan dapat menentukan jumlah maksimum nukleolus per sel.

Pada penelitian ini, dilakukan penentuan tingkat ploidi ikan patin siam menggunakan penghitungan jumlah maksimum nukleolus per sel yang diverifikasi dengan menggunakan penghitungan jumlah kromosom. Penelitian ini bertujuan menentukan tingkat ploidi ikan patin siam berdasarkan jumlah maksimum nukleolus per sel.

Bahan dan metode

Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga Juli 2018 di Kantor Cabang Dinas Kelautan dan Perikanan Wilayah Utara (CDKPWU), Instalasi Cijengkol, Kabupaten Subang. Analisis tingkat ploidi dilakukan di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Organisme Akuatik, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Pemijahan

Pemijahan dilakukan menggunakan teknik perangsangan hormonal dengan dua kali penyuntikan pada induk betina dan satu kali pada induk jantan. Proses pemijahan dilakukan melalui penyuntikan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) (Pregnyl®) dan hormon sGnRHa+Domperidone (Ovaprim®). Induk betina yang digunakan berumur 2-3 tahun dengan berat 3-5 kg ekor⁻¹ dan induk jantan berumur 1,5-2 tahun dengan berat 1,5-2 kg ekor⁻¹. Penyuntikan pertama pada induk betina menggunakan hormon hCG dengan dosis 500 IU kg⁻¹ induk, 24 jam berikutnya dilakukan penyuntikan kedua menggunakan Ovaprim dengan dosis 0,6 mL kg⁻¹ induk. Bersamaan dengan penyuntikan kedua pada induk betina, dilakukan penyuntikan induk jantan menggunakan Ovaprim dengan dosis 0,3 mL kg⁻¹. Setelah 8-10 jam dilakukan pengurutan (*stripping*) pada bagian abdominal.

Produksi ikan diploid dan tetraploid

Telur dan sperma yang telah difertilisasi dicuci menggunakan suspensi tanah untuk menghilangkan daya rekat telur. Telur yang digunakan berjumlah 5000 butir setiap kelompok. Produksi ikan diploid dihasilkan melalui fertilisasi telur dan sperma tanpa diberi induksi kejutan suhu. Ikan tetraploid diproduksi melalui fertilisasi antara telur dan sperma dan diberi

kejutan suhu dingin pada umur zigot 28 menit setelah fertilisasi dengan cara merendam zigot menggunakan wadah peletakan zigot ke dalam *styrofoam* berisi air bersuhu 4°C dengan lama waktu kejutan selama 25 menit. Zigot diploid dan tetraploid selanjutnya dipindahkan ke dalam akuarium inkubasi pada suhu air 29-30°C dan menetas setelah 20-24 jam. Sesaat setelah menetas dilakukan penghitungan persentase penetasan dengan menghitung jumlah telur yang menetas per telur yang terbuahi.

Pemeliharaan yuwana

Pemeliharaan yuwana dilakukan selama 15 hari dalam wadah bervolume 25 L dengan kepadatan yuwana berjumlah 50 ekor per wadah. Yuwana diberi pakan naupli artemia 30-36 jam setelah menetas, selama empat hari dengan frekuensi pemberian tiga jam sekali. Yuwana berumur 5-15 hari diberi pakan cacing sutera yang telah dicincang halus dan dicuci bersih dengan waktu pemberian lima jam sekali. Yuwana berumur di atas 15 hari diberi pakan ikan komersial berupa tepung (Feng Li®) dengan komposisi 40% protein, 5% lemak, 2% serat kasar, 13% abu, 11% kadar air, frekuensi pemberian tiga kali sehari. Penggantian air dilakukan pada hari ke lima setelah yuwana menetas sebanyak 30% dari total volume air. Setelah itu penggantian air dilakukan sebanyak 50% dari volume total. Pada hari ke 15 pemeliharaan dilakukan penghitungan tingkat sintasan yuwana dengan menghitung jumlah yuwana yang hidup per jumlah yuwana yang ditebar.

Pembuatan preparat nukleolus dan kromosom

Preparasi nukleolus dilakukan dengan memfiksasi sampel yuwana berumur tujuh hari menggunakan larutan Carnoy (1 Asam Asetat :

3 Etanol) selama 60 menit dengan penggantian larutan baru setiap 30 menit. Sampel dapat langsung diproses atau disimpan di lemari pendingin bersuhu 4°C selama beberapa minggu. Sampel didisosiasi dengan menambahkan tiga tetes Asam Asetat konsentrasi 50% pada gelas objek cekung selama 6-10 detik. Selanjutnya dengan menggunakan mikropipet (ukuran tip 200 µL), suspensi sel yang terbentuk dihisap dan dipindahkan ke gelas objek yang diletakkan pada *hot plate* hangat (suhu 45-55°C). Suspensi sel yang berada di gelas objek tersebut dihisap kembali dengan cepat menggunakan mikropipet sehingga membentuk lingkaran berdiameter 1-1,5 cm pada gelas objek. Selanjutnya setelah preparat kering, preparat nukleolus diwarnai menggunakan perak nitrat dengan cara menambahkan dua tetes Larutan A (10 g AgNO₃ dilarutkan dalam 20 ml Akuades) dan satu tetes larutan B (2 g Gelatin dilarutkan dalam 50 ml air kemudian ditambahkan 50 ml Gliserin, setiap 10 ml larutan campuran Gelatin+air+Gliserin ditambah dua tetes Asam Formiat). Preparat kemudian ditempatkan dalam kotak pewarnaan bersuhu 40-45°C selama 20 menit hingga berubah warna menjadi kuning kecokelatan. Preparat nukleolus dibilas dengan Akuades dan dikering-anginkan selanjutnya diamati di bawah mikroskop (Olympus CX41) pada pembesaran 400x menurut metode Howell & Black (1980) dengan beberapa modifikasi (*hot plate* bersuhu 70°C; Larutan A (4 g AgNO₃ dilarutkan dalam 8 ml Akuades); Larutan B (2 g Gelatin dilarutkan dalam 100 ml air tanpa penambahan Gliserin, setiap 10 ml larutan campuran Gelatin+air ditambah satu tetes Asam Formiat)). Penghitungan nukleolus dilakukan dengan menghitung 450-550 sel pada setiap sampel. Penentuan tingkat ploidi dilakukan

dengan cara menghitung jumlah maksimum satu, dua, tiga dan empat nukleoli per sel.

Preparasi kromosom menggunakan metode Kligerman & Bloom (1977) dengan beberapa modifikasi (0,005-0,01% w/v Kolkisin; Giemsa 4%). Preparasi kromosom teknik jaringan padat ini, diawali dengan perendaman yuwana menggunakan larutan Kolkisin 0,07 % w/v (70 mg Kolkisin dalam satu liter air pemeliharaan) selama enam hingga sembilan jam dan diaerasi dengan baik. Kemudian yuwana direndam dalam larutan KCl 0,075 M (5,6 g KCl dalam satu liter akuades) selama 60 menit dengan penggantian larutan baru setiap 30 menit. Yuwana tersebut difiksasi dengan larutan *Carnoy* selama 60 menit dengan penggantian larutan baru setiap 30 menit. Pembuatan preparat kromosom dilakukan dengan mendisosiasi sampel dan menambahkan tiga tetes Asam Asetat konsentrasi 50% pada gelas objek cekung selama 6-10 detik. Selanjutnya dengan menggunakan mikropipet (ukuran tip 200 µL), suspensi sel yang terbentuk dihisap dan dipindahkan ke gelas objek yang diletakkan pada *hot plate* hangat (suhu 45-55°C). Suspensi sel yang berada di gelas objek tersebut dihisap kembali dengan cepat menggunakan mikropipet sehingga membentuk lingkaran berdiameter 1-1,5 cm pada gelas objek dan dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan *Giemsa* 10% selama 20 menit. Setelah itu preparat kromosom dibilas dan dikering-anginkan selanjutnya diamati di bawah mikroskop (Olympus CX41) pada pembesaran 1000x. Penentuan tingkat ploidi dilakukan dengan cara menghitung jumlah kromosom (contoh: 59, 60, 61 kromosom) dalam setiap lingkaran preparat kromosom yang paling banyak ditemukan pada setiap individu yuwana.

Analisis statistik

Persentase penetasan dan tingkat sintasan dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA) dan bila terdapat pengaruh perlakuan dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* pada taraf kepercayaan 95%. Uji statistik menggunakan perangkat lunak SPSS versi 22.0.

Hasil

Persentase penetasan ikan diploid (tanpa perlakuan kejutan suhu) adalah $81,35 \pm 0,73\%$ sedangkan ikan tetraploid (dengan perlakuan kejutan suhu) adalah $3,39 \pm 1,78\%$. Persentase penetasan ikan tetraploid lebih rendah 24 kali lipat jika dibandingkan dengan ikan diploid. Tingkat sintasan setiap kelompok adalah 88,67% untuk diploid sedangkan tetraploid

83,33% setelah pemeliharaan selama 15 hari (Tabel 1).

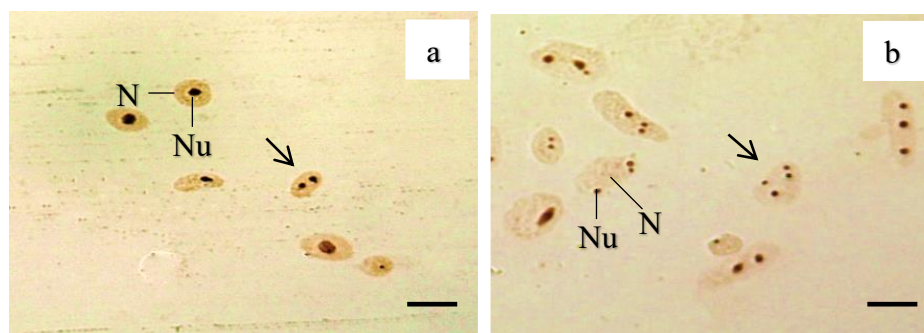
Persentase penetasan dan sintasan yang dihasilkan berbeda antara ikan diploid dengan tetraploid. Analisis sidik ragam menunjukkan bahwa nilai persentase penetasan antara ikan diploid dan tetraploid terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Analisis sidik ragam pada tingkat sintasan menunjukkan kelompok ikan diploid dan tetraploid tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$).

Perbedaan antara jumlah maksimum nukleolus per sel individu diploid dengan individu tetraploid dapat dilihat pada Gambar 1. Pengamatan nukleolus menunjukkan perbedaan warna antara nukleus dan nukleolus. Nukleus terlihat berwarna coklat sedangkan nukleolus berwarna hitam.

Tabel 1. Persentase penetasan dan tingkat sintasan kelompok diploid dan tetraploid patin siam

Kelompok	Persentase penetasan (%)	Tingkat sintasan (%)
Diploid	$81,35 \pm 0,73a$	$88,67 \pm 5,25a$
Tetraploid	$3,39 \pm 1,78b$	$83,33 \pm 5,73a$

Keterangan : Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang tidak sama berbeda nyata antar perlakuan pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan)



Gambar 1. Pewarnaan nukleolus patin siam menggunakan perak nitrat. **a** Diploid memiliki maksimum dua nukleoli per sel dan **b** tetraploid memiliki maksimum empat nukleoli per sel. **Nu**: Nukleolus; **N**: Nukleus. Tanda panah menunjukkan jumlah maksimum nukleolus. Bar = 20 μm

Identifikasi tingkat ploidi menggunakan metode penghitungan nukleolus yang diwarnai dengan perak nitrat menunjukkan frekuensi sel yang memiliki satu, dua, tiga, atau empat nukleolus disajikan pada Tabel 2. Nukleolus ikan patin siam diploid dan tetraploid memiliki variasi jumlah nukleolus dalam inti selnya. Pada penelitian ini individu diploid yang diamati memiliki jumlah nukleolus satu dan maksimum dua nukleoli per sel. Pada setiap individu diploid frekuensi sel yang ditemukan memiliki satu nukleolus per sel yakni $61,27 \pm 8,48\%$, sedangkan jumlah maksimum dua nukleoli per sel adalah $38,73 \pm 8,48\%$. Frekuensi sel dengan satu, dua, tiga atau empat nukleoli pada tetraploid patin siam dapat ditemukan dengan jumlah maksimum nukleoli per sel empat. Frekuensi sel dengan jumlah maksimum empat nukleoli per sel yang ditemukan pada setiap individu tetraploid rendah yakni $0,69 \pm 0,64\%$.

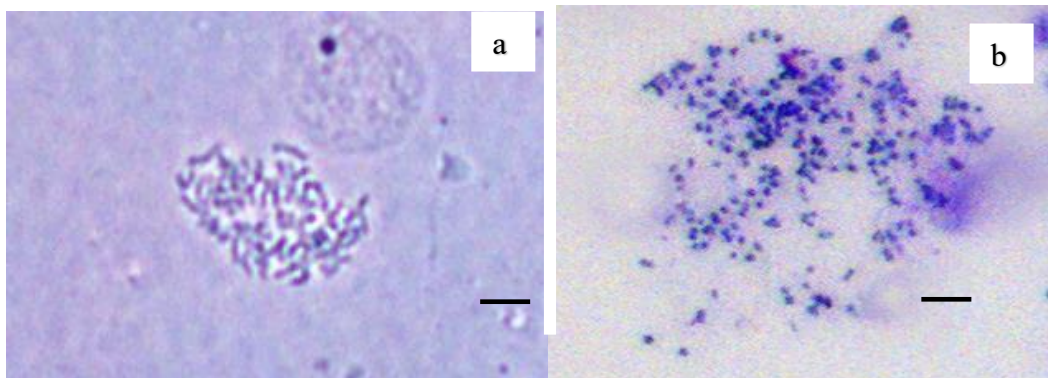
Penghitungan jumlah kromosom yang diwarnai menggunakan *Giemsa* 10% maka didapatkan jumlah kromosom yang paling sering ditemukan pada individu diploid berjumlah 60 ($2n=60$) sedangkan pada individu tetraploid memiliki kromosom dengan jumlah 120 ($4n=120$) (Gambar 2).

Hubungan antara jumlah maksimum nukleolus yang diperoleh berkorelasi dengan tingkat ploidi patin siam disajikan pada Tabel 3. Pengamatan nukleolus ikan patin siam menunjukkan semakin tinggi jumlah maksimum nukleolus dalam satu sel yang ditemukan, maka akan semakin tinggi tingkat ploidi. Jumlah maksimum dua nukleoli per sel menunjukkan tingkat ploidi diploid ($2n$), sedangkan jika jumlah maksimum empat nukleoli per sel menunjukkan tingkat ploidi tetraploid ($4n$). Jika dilihat pada Tabel 3 terdapat anomali yang muncul pada jumlah maksimum tiga nukleoli per sel menunjukkan tingkat ploidi tetraploid ($4n$).

Tabel 2. Distribusi nukleolus patin siam diploid dan tetraploid

Ikan	Jumlah ^a	Jumlah nukleolus per sel (%)			
		Satu	Dua	Tiga	Empat
Diploid	13	$61,27 \pm 8,48$	$38,73 \pm 8,48$	0	0
Tetraploid	27	$58,71 \pm 12,60$	$37,13 \pm 9,16$	$3,72 \pm 4,73$	$0,69 \pm 0,64$

Keterangan: ^aJumlah individu yang diamati



Gambar 2. Kromosom patin siam yang diwarnai menggunakan *Giemsa* 10%. **a, b** Kromosom diploid dan tetraploid. Bar = 5 µm

Tabel 3. Hubungan jumlah maksimum nukleolus dengan tingkat ploidi pada patin siam

No. sampel	Sebaran jumlah nukleolus per sel (%)					Tingkat ploidi ^a
	Maks	1	2	3	4	
1	2	210 (49,41)	215 (50,59)			2n
2	2	436 (67,49)	210 (32,51)			2n
3	4	256 (46,55)	245 (44,55)	37 (6,73)	12 (2,18)	4n
4	2	299 (56,52)	230 (43,48)			2n
5	4	165 (49,85)	145 (43,81)	16 (4,83)	5 (1,51)	4n
6	3	267 (50,76)	241 (45,82)	18 (3,42)		4n
7	3	292 (54,17)	244 (45,27)	3 (0,56)		4n
8	2	398 (72,76)	149 (27,24)			2n
9	2	297 (56,25)	231 (43,75)			2n
10	4	324 (60,22)	202 (37,55)	11 (2,04)	1 (0,19)	4n
11	4	268 (52,55)	194 (38,04)	40 (7,84)	8 (1,57)	4n
12	3	392 (72,06)	141 (25,92)	11 (2,02)		4n
13	3	326 (58,53)	226 (40,57)	5 (0,90)		4n
14	2	316 (57,45)	234 (42,55)			2n
15	3	369 (60,20)	235 (38,34)	9 (1,47)		4n
16	3	272 (50,09)	265 (48,80)	6 (1,10)		4n
17	4	175 (41,97)	213 (51,08)	22 (5,28)	7 (1,68)	4n
18	2	421 (79,89)	106 (20,11)			2n
19	4	319 (55,87)	225 (39,40)	24 (4,20)	3 (0,53)	4n
20	3	350 (68,09)	163 (31,71)	1 (0,19)		4n
21	4	415 (72,83)	150 (26,36)	3 (0,53)	1 (0,18)	4n
22	3	369 (60,20)	235 (38,34)	9 (1,47)		4n
23	2	295 (52,68)	265 (47,32)			2n
24	4	248 (43,82)	231 (40,81)	84 (14,84)	3 (0,53)	4n
25	2	327 (61,81)	202 (38,19)			2n
26	4	390 (74,71)	126 (24,14)	5 (0,96)	1 (0,19)	4n
27	2	360 (66,18)	184 (33,82)			2n
28	4	383 (74,66)	126 (24,56)	3 (0,58)	1 (0,19)	4n
29	4	212 (35,75)	283 (47,72)	94 (15,85)	4 (0,67)	4n
30	4	377 (61,00)	219 (35,44)	20 (3,24)	2 (0,32)	4n
31	3	364 (70,68)	145 (28,16)	6 (1,17)		4n
32	4	388 (80,50)	92 (19,09)	1 (0,21)	1 (0,21)	4n
33	4	242 (53,42)	204 (45,03)	5 (1,10)	2 (0,44)	4n
34	2	338 (62,71)	201 (37,29)			2n
35	2	306 (56,77)	233 (43,23)			2n
36	3	412 (75,74)	128 (23,53)	4 (0,74)		4n
37	4	373 (70,24)	156 (29,38)	1 (0,19)	1 (0,19)	4n
38	2	324 (56,54)	249 (43,46)			2n
39	4	327 (56,48)	233 (40,24)	17 (2,94)	2 (0,35)	4n
40	4	203 (34,23)	290 (48,90)	95 (16,02)	5 (0,84)	4n

Keterangan: ^aTingkat ploidi ditentukan dengan melihat jumlah maksimum nukleolus per sel setiap individu

Pembahasan

Rendahnya persentase penetasan kelompok individu tetraploid berkaitan dengan kejutan suhu yang ekstrem dan lama kejutan yang diterima zigot. Hartono *et al.* (2016) menyatakan guncangan, kejutan, dan perubahan suhu drastis sangat berisiko selama periode awal embrio yang mengakibatkan banyaknya kematian zigot. Perlakuan kejutan suhu mengakibatkan kerusakan pro nukleus, mengubah komposisi sitoplasma sel telur, kerusakan benang spindel, terganggunya aktivitas enzim, kerusakan membran zigot dan selama 15 hari pemeliharaan yuwana, sintasan antara kelompok diploid dengan kelompok tetraploid memiliki sintasan yang relatif sama, yakni di atas 80% (Tabel 1). Sintasan yang lebih baik kemungkinan disebabkan oleh penanganan yuwana yang baik selama periode pemeliharaan. Piferrer (2000) menyatakan penurunan sintasan disebabkan oleh penanganan setelah induksi kejutan suhu yang kurang baik, bukan dari pengaruh kejutan suhu terhadap embrio.

Berdasarkan penghitungan nukleolus, didapatkan hubungan antara jumlah maksimum nukleolus per sel dan tingkat ploidi yakni pada individu diploid memiliki jumlah maksimum dua nukleoli per sel, sedangkan pada individu tetraploid jumlah maksimum empat nukleoli per sel. Dilihat dari proporsi jumlah maksimum nukleolus per sel, ditemukan indikasi bahwa pada individu tetraploid proporsi tersebut sangat rendah (0,69%) dibandingkan dengan individu diploid (38,73%). Persentase jumlah maksimum nukleolus per sel yang lebih rendah pada individu tetraploid diduga disebabkan penyatuan nukleolus atau *Nucleolar Organizer Regions* (NORs) gagal membentuk nukleolus selama siklus sel berlangsung sehingga mengakibatkan penurunan jumlah maksimum nukleolus yang

teramati (Verdun 2011). Penelitian yang dilakukan Ibrahim (2017) pada patin siam triploid menghasilkan frekuensi sel yang memiliki maksimum tiga nukleoli per sel dengan persentase rendah yakni 2,43-13,27% dari total sel yang diamati. Berdasarkan data ini dapat dikemukakan bahwa semakin tinggi tingkat ploidi maka proporsi dengan jumlah maksimum nukleolus per selnya semakin rendah. Hal yang sama ditemukan oleh Okumura *et al.* (2001) yakni terjadi penurunan frekuensi sel dengan jumlah maksimum tiga nukleoli per sel pada abalon Pasifik *Haliotis discus hannai*. Carman *et al.* (1992) menyatakan variasi yang terjadi pada jumlah maksimum nukleolus dapat disebabkan oleh hasil penyatuan dari beberapa nukleolus menjadi satu bentuk akibat proses fisiologi selama siklus sel. Penyatuan ini juga ditemukan pada nukleolus sel diploid manusia yang sebenarnya memiliki 10 terbentuk setelah mitosis, menurun jumlahnya dan meningkat ukurannya selama fase G_1 tetapi secara cepat tumbuh dan bergabung menjadi satu membentuk satu nukleolus yang besar (Farley *et al.* 2015). Anomali yang ditemukan pada jumlah maksimum tiga nukleoli per sel menunjukkan tetraploid ($4n$). Hal yang sama ditemukan Carman *et al.* (1992) pada ikan mas dengan jumlah maksimum dua nukleoli per sel menunjukkan triploid ($3n$). Hal tersebut terjadi berkaitan dengan kemampuan pewarnaan menggunakan perak nitrat yang hanya mewarnai nukleolus (*Nucleoli Organizer Regions*/NORs) yang sedang aktif saat sintesis ribosom (Jankun *et al.* 2007). Hal lain yang diduga menyebabkan terjadinya anomali ini yakni dalam pembentukan individu tetraploid kejutan suhu dilakukan untuk menghambat pembelahan sel saat mitosis I, di saat itu *polar body* II telah terlepas dari zigot beberapa menit setelah fertilisasi sehingga

tidak mungkin individu yang terbentuk adalah individu triploid (Piferrer *et al.* 2009). Hubungan jumlah maksimum nukleolus per sel dengan tingkat ploidi memberikan hasil yang cukup konsisten (individu diploid memiliki jumlah maksimum dua nukleoli per sel, sedangkan pada individu tetraploid jumlah maksimum empat nukleoli per sel) sehingga penghitungan jumlah nukleolus sebagai metode tidak langsung dapat menjadi prediktor penentuan tingkat ploidi pada ikan patin siam. Fenomena rendahnya proporsi sel yang memiliki jumlah maksimum empat nukleoli per sel pada individu tetraploid tidak serta merta menunjukkan inkonsistensi penerapan metode ini. Hal tersebut dapat diatasi dengan mengamati lebih banyak sel dalam setiap sampel (1500–2000 sel), sehingga sel yang memiliki jumlah maksimum empat nukleoli per sel akan lebih banyak ditemukan jumlahnya.

Hubungan antara jumlah nukleolus dan jumlah set kromosom telah digunakan untuk mengidentifikasi poliploidi pada ikan. Pada interfase sel somatik, terdapat hubungan antara jumlah nukleolus yang terlihat dengan jumlah set kromosom (Schofer & Weipoltshammer 2018). Verifikasi penghitungan nukleolus dengan menggunakan metode langsung yakni penghitungan kromosom menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat ploidi maka semakin banyak pula jumlah kromosom yang ditemukan. Hal yang sama ditemukan Ibrahim *et al.* (2017) pada patin siam triploid memiliki jumlah kromosom 1,5 kali lipat lebih banyak dibandingkan dengan patin siam diploid. Walaupun penghitungan kromosom merupakan metode yang unggul dan tepat dalam penentuan tingkat ploidi, tetapi analisis kromosom membutuhkan keahlian yang tinggi dan waktu yang relatif lama (Caterina *et al.* 2014). Penentuan tingkat ploidi

menggunakan penghitungan jumlah nukleolus yang diwarnai dengan perak nitrat dapat diandalkan pada pekerjaan yang rutin maupun di lapangan karena penerapannya yang sederhana, relatif lebih cepat, dan lebih murah dibandingkan beberapa metode lainnya. Kim *et al.* (2017) menyatakan sampel preparat nukleolus dapat menggunakan berbagai jaringan spesimen tubuh dalam jumlah sedikit, dapat langsung dikerjakan di lapangan, dan dilakukan tanpa harus membunuh ikan. Keunggulan lainnya metode ini dapat diterapkan saat tahap awal embrio atau ikan berumur muda tanpa harus menunggu ukuran ikan besar sehingga dapat mengurangi biaya tinggi dalam pemeliharaan sebelum identifikasi ploidi. Adanya verifikasi menggunakan penghitungan kromosom yang hasilnya berhubungan dengan jumlah maksimum nukleolus, meyakinkan bahwa penghitungan nukleolus dapat menjadi metode yang dapat diandalkan dalam penentuan tingkat ploidi.

Simpulan

Penghitungan jumlah nukleolus sebagai metode tidak langsung dapat menjadi metode dalam penentuan tingkat ploidi pada ikan patin siam dengan sedikit kelemahan yaitu rendahnya jumlah maksimum empat nukleoli per sel dalam individu tetraploid.

Persantunan

Penulis berterima kasih kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan beasiswa dan Kantor Cabang Dinas Kelautan dan Perikanan Wilayah Utara yang menyediakan tempat, bahan, dan materi selama penelitian.

Daftar pustaka

Bai Z, Liu F, Li J, Yue GH. 2011. Identification of triploid individuals and clonal lines in *Carassius auratus* complex using

- microsatellites. *International Journal of Biological Sciences*, 7(3): 279-285.
- Carman O, Takashi O, Takashima F. 1992. Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12): 2303-2309.
- Caterina F, Francesca A, Giuseppe P, Alessandro Z, Francesco F. 2014. Effect of three different anticoagulants and storage time on hematological parameters of *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries Aquatic Sciences*, 14(1): 615-621.
- Farley KI, Surovtseva Y, Merkel J, Baserga SJ. 2015. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma*, 124(3): 323-331.
- Gil HW, Kong HJ, An CM, Kim BS, Lim SG, Park IS. 2016. Cytogenetic study of diploid and induced tetraploid in Korean rose bitterling *Rhodeus uyekii*. *Springerplus*, 5(1): 186-196.
- Hartono DP, Witoko P, Purbosari N. 2016. The effect of heat shock on the tetraploidy of catfish, *Pangasius hypophthalmus*. *Bioflux*, 9(3): 597-603.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer region with protective colloidal developer: a 1 – step methods. *Experientia*, 36(8): 1014-1015.
- Ibrahim Y, Soelistyowati DT, Carman O. 2017. Triploid striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*: growth performance and gonadal development. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(1): 76-82.
- Jankun M, Kuzminski H, Selezniow GF. 2007. Cytologic ploidy determination in fish – an example of two salmonid species. *Environmental Biotechnology*, 3(2): 52-56.
- Jewsiewicka AS, Kucinski M, Dobosz S, Ocalewicz, Jankun M. 2015. Chromosomal characteristic and distribution of rDNA sequences in the brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814). *Genetica*, 143(4): 425-432.
- Kim HS, Chung KH, Son JH. 2017. Comparison of different ploidy detection methods in *Oncorhynchus mykiss*, the rainbow trout. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(29): 1-7.
- Kligerman AD, Bloom SE. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 34(2): 266-269.
- Mukti AT. 2016. Triploidi dan dimorfisme seks, performa reproduksi dan produksinya pada ikan nila *Oreochromis niloticus*, *Disertasi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Mukti AT. 2017. Metode penentuan ploidi pada ikan nila *Oreochromis niloticus* menggunakan kombinasi sebaran kromosom dan nukleoli secara bersamaan. *Jurnal Akuakultur Sungai dan Danau*, 2(1): 43-50.
- Okumura S, Furukawa S, Kawai T, Takahashi S, Yamamori K. 2001. Comparison of nucleoli number in diploid and triploid larva of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Science*, 67(1): 176-178.
- Piferrer F, Beaumont A, Falguiere JC, Flajshans M, Haffray P, Colombo L. 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3-4): 125-156.
- Piferrer F, Cal RM, Alvarez-Blazquez B, Sanchez L, Martinez P. 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture*, 188(1-2): 79-90.
- Pradeep PJ, Srijaya TC, Jose D, Papini A, Hassan A, Chatterji AK. 2014. Identification of diploid and triploid red tilapia by using erythrocyte indices. *Caryologia*, 6(4): 485-492.
- Schofer C, Weipoltshammer K. 2018. Nucleolus and chromatin. *Histochemistry Cell Biology*, 150(3): 209-225.
- Verdun DH. 2011. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2(3): 189-194.