

PERBEDAAN KEBERHASILAN TINGKAT POLIPLIPOIDISASI IKAN MAS (*Cyprinus carpio* Linn.) MELALUI KEJUTAN PANAS

Akhmad Taufiq Mukti

Bagian Anatomi Veteriner (Embriologi) & Program Studi S-1 Budidaya Perairan
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRACT

The easiest, cheapest, simplest and efficient polyploidization method was heat shock treatment. Each fish species has different tolerance either initial time, temperature or duration of heat shock. The aim of this study were to show and determine the heat shock effects on differentiation of hatching rate, abnormality, survival rate, and successful polyploidization of common carp. The method that used in this study was experiment. Treatment that used was heat shock 40° C during 1.5 minutes of common carp eggs to 3 and 29 minutes after fertilization. Ten replicates were carried out for each treatment. Parameters test were hatching rate, abnormality, survival rate and polyploidy induction by counting of nucleolus number. Data analysis that used was descriptive. The result of this study indicated that heat shock treatment influenced on hatching rate, abnormality, survival rate and polyploidy induction of the common carp polyploidization. Hatching rate of common carp, triploidy and tetraploidy were $22.63 \pm 8.36\%$ and $11.10 \pm 8.60\%$, abnormality $13.81 \pm 4.67\%$ and $24.86 \pm 8.37\%$, survival rate $52.64 \pm 8.46\%$ and $55.04 \pm 8.15\%$ and polyploidy induction $70 \pm 7.07\%$ and $60 \pm 7.07\%$, respectively.

Key words: heat shock, fertilization, polyploidization, hatching rate, abnormality

PENGANTAR

Manipulasi kromosom mungkin dilakukan selama siklus nukleus dalam pembelahan sel, dasarnya adalah penambahan atau pengurangan set haploid atau diploid. Pada ikan dan hewan lainnya dengan fertilisasi eksternal, proses-proses buatan dapat dilakukan untuk salah satu gamet sebelum fertilisasi atau telur terfertilisasi pada beberapa periode selama formasi pada zigot (Purdom, 1983). Salah satu metode manipulasi kromosom adalah poliploidisasi.

Poliploidisasi pada ikan dapat dilakukan melalui perlakuan secara fisik seperti kejutan (*shock*) suhu panas maupun dingin, *hydrostatic pressure* atau secara kimiawi untuk mencegah peloncatan *polar body* II atau pembelahan sel pertama pada telur terfertilisasi (Thorgaard, 1983; Yamazaki, 1983; Carman *et al.*, 1992; Johnstone, 1993; Hussain, 1996; Shepperd dan Bromage, 1996). Masing-masing memiliki intensitas, lama dan waktu perlakuan yang kritis dan perlu evaluasi lebih lanjut, sedangkan tiap spesies mungkin memiliki perbedaan dalam merespons masing-masing perlakuan tersebut (Johnstone, 1993). Peloncatan *polar body* II terjadi 3–7 menit setelah fertilisasi pada beberapa spesies (Carman *et al.*, 1991), sedangkan pembelahan mitosis pada ikan mas terjadi 20–40 menit setelah fertilisasi (Komen *et al.*, 1990).

Kejutan suhu selain murah dan mudah, juga efisien dapat dilakukan dalam jumlah banyak (Rustidja, 1991). Kejutan panas mudah dan sering digunakan untuk aplikasi poliploidisasi pada beberapa spesies ikan. Komen (1990) menyatakan, suhu panas lebih efektif untuk mencegah terlepasnya *polar body* II. Thorgaard (1983) menjelaskan, pendekatan praktis untuk induksi poliploidi melalui kejutan panas merupakan perlakuan aplikatif sesaat setelah fertilisasi (untuk induksi triploidi) atau sesaat setelah pembelahan pertama (untuk induksi tetraploidi) pada suhu *sublethal*. Tiga hal yang perlu diperhatikan dalam perlakuan kejutan suhu pada telur, yaitu waktu awal kejutan, suhu kejutan, dan lama kejutan (Don dan Avtalion, 1986). Nilai parameter tersebut berbeda untuk setiap spesies (Pandian dan Varadaraj, 1988).

Kejutan suhu 3 menit setelah fertilisasi dapat menghasilkan gynogenesis meiosis pada ikan mas (Prastowo, 1994) dan triploid massal pada *Clarias batrachus* L. (Rustidja, 1993; Rustidja *et al.*, 1993). Kejutan suhu panas 40° C umum digunakan pada ikan mas (Komen *et al.*, 1990; Sumantadinata, 1990 dalam Lukman, 1991; Bongers *et al.*, 1993) dengan lama kejutan bervariasi, yaitu antara 1,5–2 menit (Sumantadinata, 1990 dalam Lukman, 1991), 2 menit (Gustiano *dkk.*, 1990; Bongers *et al.*, 1993) atau 1–3 menit (Komen *et al.*, 1990). Ikan mas hasil gynogenesis mitosis dihasilkan melalui kejutan panas 29

menit setelah fertilisasi (Triwahyudi, 1994) atau 28–30 menit setelah fertilisasi (Komen *et al.*, 1990).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dan menguji pengaruh kejutan panas terhadap perbedaan derajat penetasan, abnormalitas, derajat kelangsungan hidup dan keberhasilan poliploidisasi pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.). Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan tambahan informasi dan aplikasi lapang program poliploidisasi ikan mas dalam peningkatan kualitas produksi benih ikan mas.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Pengembangan Budidaya Air Tawar (BPBAT) Umbulan Pasuruan Jawa Timur. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Perlakuan yang digunakan adalah triploidisasi dan tetraploidisasi serta kontrol dengan ulangan 10 kali untuk masing-masing perlakuan.

Pemijahan dan *Stripping* Induk

Induk ikan mas betina (berat 2,0–3,0 kg) dan jantan (berat 1,5–2,0 kg), masing-masing sebanyak 3 dan 6 ekor dimasukkan ke dalam kolam pemijahan ukuran $2 \times 5 \times 1$ m dan ditambah substrat berupa kakaban yang terbuat dari ijuk. Induk ikan mas umumnya akan melakukan perkawinan secara alami pada malam hari (tengah malam) dengan selang waktu 11–18 jam setelah dipasangkan. Setelah nampak tanda-tanda ikan mulai memijah, induk ikan mas betina dan jantan ditangkap dan dilakukan pengurutan di bagian abdominal (*stripping*) untuk mendapatkan (koleksi) telur dan sperma ikan mas. Telur-telur yang diperoleh kemudian ditampung dalam mangkok plastik kering, sedangkan sperma ditampung dalam tabung reaksi yang di dalamnya berisi larutan NaCl Fisiologis dengan pengenceran 10 kali. Larutan sperma disimpan sementara dalam *refrigerator* suhu 4°C .

Fertilisasi Buatan

Telur ikan mas dalam mangkok plastik hasil *stripping* diambil menggunakan spatula secara acak, diletakkan dalam mangkok plastik bersih-kering dan ditambah larutan sperma sebanyak 2–3 tetes. Campuran larutan sperma dan telur diaduk secara perlahan menggunakan bulu ayam. Kemudian, ditambahkan air bersih sebanyak 3–4 tetes untuk melangsungkan proses fertilisasi telur dan secara perlahan-lahan diaduk secara merata menggunakan bulu ayam. Waktu fertilisasi dicatat saat pertama kali pencampuran air bersih. Setelah 1 menit, telur terfertilisasi disebar dalam saringan kasa diameter 20 cm dan tinggi 6 cm yang telah

ditempatkan dalam bak plastik volume 25 liter berisi larutan garam dan urea (larutan penyubur) dengan perbandingan 4 : 3 untuk setiap 1 liter air selama 0,5 menit. Selanjutnya, telur dalam saringan kasa dimasukkan bak inkubasi yang terbuat dari *fiber glass* volume 1 ton dengan suhu air 26°C .

Perlakuan Poliploidisasi

Tiga menit setelah fertilisasi (triploidisasi) dan 29 menit setelah fertilisasi (tetraploidisasi), telur dalam saringan kasa (masing-masing diulang sebanyak 10 buah) dimasukkan *box shocking* untuk perlakuan kejutan panas (suhu air 40°C) selama 1,5 menit. Setelah perlakuan kejutan panas, telur dalam saringan kasa dibilas dengan larutan Ringer's. Untuk kontrol, maka telur dalam saringan kasa tidak diperlakukan kejutan panas, tetapi hanya dibilas dengan larutan Ringer's. Kemudian, dimasukkan dalam bak penetasan telur bersama-sama dengan telur hasil perlakuan triploidisasi dan tetraploidisasi.

Penetasan Telur dan Pemeliharaan Larva

Penetasan telur dilakukan di dalam bak penetasan telur yang terbuat dari *fiber glass* volume 1 ton dengan suhu air 28°C dan ditambah *Methylene Blue* 1 ppm. Kira-kira 8 jam setelah fertilisasi, dilakukan penghitungan jumlah telur (sampel) yang digunakan untuk masing-masing perlakuan, yaitu melalui penghitungan jumlah telur terfertilisasi dan jumlah telur tidak terfertilisasi dari masing-masing perlakuan. Telur-telur yang tidak terfertilisasi (rusak) dipisahkan dengan telur-telur terfertilisasi dan dihilangkan dari saringan.

Telur ikan mas akan menetas kira-kira 2–3 hari. Selanjutnya, dilakukan penghitungan jumlah telur yang menetas dan jumlah larva yang cacat secara morfologis (abnormal). Larva ikan mas yang normal (sehat) semua perlakuan dipindahkan ke dalam akuarium ukuran $1 \times 0,6 \times 0,8$ m untuk pemeliharaan larva dan masing-masing perlakuan ditebar sebanyak 125 ekor. Selama pemeliharaan (30 hari), larva diberi pakan suspensi kuning telur (selama 3–4 hari), pakan alami *Artemia* spp., cacing *Tubifex* sp., dan pakan pellet yang diberikan secara bertahap sesuai dengan perkembangan larva ikan mas. Suhu air media pemeliharaan diatur 28°C . Pada akhir pemeliharaan (30 hari), dihitung jumlah larva ikan mas yang bertahan hidup (kelangsungan hidup).

Analisis Poliploidi

Analisis poliploidi dilakukan melalui penghitungan jumlah nukleolus ikan mas hasil perlakuan poliploidisasi

dengan menggunakan pewarnaan perak nitrat (*silver staining*) seperti prosedur Howell dan Black (1980). Jaringan yang digunakan adalah sebagian potongan sirip *pectoral* dan sirip ekor larva ikan mas. Jumlah larva ikan mas yang digunakan sebagai sampel untuk analisis nukleolus sebanyak 10 ekor untuk masing-masing perlakuan dan diambil secara acak (*random sampling*).

Parameter dan Analisis Data

Parameter yang diuji adalah derajat penetasan, abnormalitas, derajat kelangsungan hidup dan keberhasilan induksi poliploidisasi ikan mas hasil perlakuan poliploidisasi. Analisis data dilakukan secara deskriptif.

HASIL

Tabel 1. Rata-rata jumlah telur sampel, jumlah telur terfertilisasi, derajat fertilisasi, jumlah telur menetas, derajat penetasan, jumlah larva cacat, abnormalitas, derajat kelangsungan hidup, dan keberhasilan induksi poliploidisasi ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) kontrol, triploid dan tetraploid

Parameter	Kontrol	Poliploidisasi	
		Triploid	Tetraploid
Jumlah telur sampel (butir)	671	684	611
Jumlah telur terfertilisasi (butir)	667	681	607
Derajat fertilisasi (%)	99,31 ± 0,83	99,59 ± 0,68	99,25 ± 1,08
Jumlah telur menetas (butir)	183	176	89
Derajat penetasan (%)	25,94 ± 6,76	22,63 ± 8,36	11,10 ± 8,60
Jumlah larva cacat (ekor)	12	23	20
Abnormalitas (%)	6,83 ± 2,06	13,81 ± 4,67	24,86 ± 8,37
Jumlah larva bertahan hidup (ekor)	94	65	68
Derajat kelangsungan hidup (%)	75,52 ± 7,97	52,64 ± 8,46	55,04 ± 8,15
Jumlah sel/nukleus (sel)	129	116	111
Keberhasilan induksi poliploidisasi (%)	100 ± 0,00	70 ± 7,07	60 ± 7,07

Derajat penetasan ikan mas hasil triploidisasi sebesar 22,63 ± 8,36% dan lebih tinggi daripada derajat penetasan ikan mas hasil tetraploidisasi (11,10 ± 8,60%), tetapi lebih rendah bila dibandingkan dengan ikan mas kontrol sebesar 25,94 ± 6,76%. Derajat penetasan telur ikan mas dalam penelitian ini sangat rendah, meskipun derajat fertilisasinya cukup tinggi, yaitu di atas 99% (Tabel 1).

Jumlah larva ikan mas cacat untuk masing-masing perlakuan menunjukkan perbedaan yang relatif besar, baik antara kontrol dengan hasil poliploidisasi maupun antara ikan mas triploid dan tetraploid dengan perbedaan persentase abnormalitas sebesar 7–11% (lihat Tabel 1).

Keabnormalitasan (cacat) larva ikan mas dapat diamati dari bentuk kepala, tubuh dan atau ekor yang bengkok, tubuh menyusut atau lebih pendek dari ukuran normal maupun pembesaran kelopak mata dan kepala.

Derajat kelangsungan hidup larva ikan mas hasil poliploidisasi antara triploid dan tetraploid berkisar antara 52–55%. Derajat kelangsungan hidup ikan mas hasil poliploidisasi ini relatif rendah bila dibandingkan dengan ikan mas kontrol yang mencapai di atas 75% (lihat Tabel 1).

Analisis ploidisasi dari perlakuan kejutan panas 40° C selama 1,5 menit pada triploidisasi dan tetraploidisasi telah menghasilkan induksi poliploidisasi, masing-masing sebesar 70 ± 7,07% dan 60 ± 7,07%. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan kejutan panas dan waktu kejutan tersebut relatif efektif untuk membuat poliploidisasi pada ikan mas. Ikan mas triploid memiliki 3 nukleolus di dalam satu nukleus sel, sedangkan ikan mas tetraploid memiliki 4 nukleolus (Gambar 1).



Gambar 1. Jumlah nukleolus ikan mas triploid = 3 (a) dan tetraploid = 4 (b) n = nukleus dan nu = nukleolus

PEMBAHASAN

Umumnya persentase penetasan ikan secara normal berkisar antara 50–80 % (Richter dan Rustidja, 1985). Rendahnya derajat penetasan telur ikan mas dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: kualitas telur, kualitas air media inkubasi (penetasan) dan perlakuan kejutan panas. Kualitas telur dan kualitas air media inkubasi sangat menentukan keberhasilan proses penetasan telur. Kualitas telur yang baik dan didukung oleh kualitas air media yang memadai dapat membantu kelancaran pembelahan sel dan perkembangan telur untuk mencapai tahap akhir terbentuknya embrio ikan. Yatim (1990) dan Effendie (1997) menyatakan, salah satu faktor kualitas air yang penting dalam memengaruhi pembelahan sel (penetasan telur) adalah suhu air medium.

Tipe telur ikan mas yang bersifat melekat (*adhesif*) kemungkinan besar sebagai satu faktor kualitas telur yang menyebabkan rendahnya derajat penetasan pada telur ikan mas. Sifat telur ikan mas yang melekat, membutuhkan tempat pelekatan atau substrat yang baik. Telur ikan mas yang bersifat *adhesif* yaitu melekat pada substrat atau antara telur yang satu dengan telur yang lain, sering mengakibatkan telur-telur tersebut tidak dapat menetas karena difusi oksigen menjadi berkurang (Sumantadinata, 1991). Kekurangan oksigen merupakan salah satu penyebab adanya kematian pada telur atau embrio yang sedang berkembang (Woyanarovich dan Horvath, 1980). Sifat *adhesif* telur ikan mas disebabkan oleh adanya lapisan *gluco-protein* (Woyanarovich dan Horvath, 1980) atau *globuline* (Hardjamulia, 1979) pada permukaan telur. Blaxter (1969) menyatakan, perbedaan substrat sebagai inkubasi dapat berpengaruh terhadap perkembangan pertama dan fisiologis keturunan.

Rendahnya derajat penetasan ikan mas poliploid juga diakibatkan oleh pengaruh perlakuan kejutan suhu panas yang diberikan pada telur dalam proses poliploidisasi. Tave (1993) mengemukakan, mortalitas yang terjadi kemungkinan disebabkan oleh beberapa macam efek merugikan dari perlakuan kejutan pada sitoplasma telur. Perlakuan kejutan suhu dapat mengakibatkan kerusakan pada benang-benang spindel yang terbentuk saat proses pembelahan sel dalam telur. Kejutan suhu dan tekanan mengakibatkan rusaknya mikrotubulus yang membentuk spindel selama pembelahan (Dustin, 1977 dalam Gervai *et al.*, 1980).

Suhu media inkubasi yang terlalu tinggi dapat mengganggu aktivitas enzim penetasan pada telur dan mengakibatkan pengerasan pada *chorion*, sehingga menghambat proses penetasan pada telur dan dapat mengakibatkan terjadinya keabnormalitasan (cacat) pada larva ikan yang dihasilkan. Rieder dan Bajer (1978) dalam Bidwell *et al.* (1985) mengemukakan, larva cacat dapat disebabkan oleh lapisan terluar dari telur (*chorion*) yang mengalami pengerasan, sehingga embrio akan sulit untuk keluar. Setelah *chorion* dapat dipecahkan, maka embrio akan lahir dengan keadaan tubuh yang cacat.

Tingginya jumlah larva cacat pada ikan mas hasil poliploidisasi kemungkinan disebabkan karena adanya gangguan pada saat pembelahan mitosis pertama yang mengakibatkan hilangnya beberapa kromosom dan mereduksi penggandaan kromosom dalam siklus sel berikutnya. Hal ini mengakibatkan terjadinya ketidakseimbangan jumlah kromosom di dalam tubuh dan juga hilangnya beberapa informasi genetik dalam kromosom

yang hilang ataupun tereduksi tersebut (Alridge *et al.*, 1989). Larva cacat dan kematian tinggi umumnya terjadi pada saat telur belum menetas (embrio) dan saat pertama kali larva ikan mencari makan dari luar (setelah kuning telur dalam tubuhnya habis).

Derajat kelangsungan hidup ikan mas hasil poliploidisasi yang relatif rendah bila dibandingkan dengan ikan mas kontrol kemungkinan besar akibat rendahnya kemampuan ikan-ikan poliploid dalam menangkap oksigen terlarut dalam air. Kemampuan pengikatan oksigen terlarut ikan-ikan poliploid sangat rendah bila dibandingkan dengan ikan normal. Kelangsungan hidup ikan poliploid pada fase larva pertama kali makan umumnya berbeda dengan diploid, yaitu lebih rendah bila dibandingkan dengan diploid (Thorgaard, 1992; Mair, 1993; Purdom, 1993; Santiago *et al.*, 1993).

Keberhasilan poliploidisasi melalui perlakuan kejutan suhu sangat dipengaruhi oleh suhu kejutan, waktu kejutan dan lama kejutan, seperti disampaikan oleh Don dan Avtalion (1986) dan tergantung juga pada umur dan kualitas (kematangan) telur (Pandian dan Varadaraj, 1990). Triploidisasi pada ikan relatif lebih mudah untuk diproduksi menggunakan perlakuan fisik atau kimia sesaat setelah fertilisasi dengan menghambat pembelahan meiosis atau peloncatan *polar body* II (Carman *et al.*, 1991). Shepperd dan Bromage (1996) mengatakan, induksi triploidi dapat dilakukan menggunakan kejutan lingkungan seperti panas, dingin, tekanan dan kimiawi selama periode kritis sesaat setelah fertilisasi dan peloncatan *polar body* II terjadi antara 3–7 menit setelah fertilisasi pada beberapa spesies (Carman *et al.*, 1991). Arai dan Wilkins (1987) melaporkan bahwa perlakuan kejutan suhu panas dalam waktu singkat efektif untuk induksi triploidi, tetapi merugikan secara signifikan pada kelangsungan hidupnya.

Minrong *et al.* (1993) menyatakan, periode dengan sensitif tinggi untuk menghasilkan ikan tetraploid menggunakan perlakuan kejutan panas dicapai pada waktu menutupnya konjugasi pronuklei betina dan jantan serta lisisnya membran nuklear yang mencapai metafase mitosis I. Pada ikan mas, diperkirakan antara 20–40 menit setelah fertilisasi (Komen *et al.*, 1990).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan kejutan suhu panas 40° C selama 1,5 menit memengaruhi tingkat poliploidisasi ikan mas. Ikan mas hasil triploidisasi memiliki derajat penetasan lebih tinggi, abnormalitas lebih rendah, derajat kelangsungan hidup lebih rendah dan keberhasilan induksi poliploidi lebih tinggi daripada ikan mas hasil tetraploidisasi. Perlakuan kejutan suhu panas ini dapat dimanfaatkan dan dikembangkan secara luas untuk

proses poliploidisasi pada ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn.) maupun spesies ikan lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis haturkan terima kasih kepada Dr. Ir. H. Rustidja, M.S., Prof. Drs. H. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., D.Sc., Dr. Ir. H. Mohammad Sasmito Djati, M.S., Ir. Kartojo Ardiwinoto beserta keluarga dan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Alridge F J, Marston RQ, dan Shireman JV, 1989. Induced Triploids and Tetraploids in Bighead Carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. Verified by Multi-Embryo Cytofluorometric Analysis. *Aquaculture*, 87: 121–131.
- Arai K, dan Wilkins NP, 1987. Triploidization of Brown Trout, *Salmo trutta* by Heat Shock. *Aquaculture*, 64: 97–103.
- Bidwell CA, Chrisman CL, dan Libey GS, 1985. Polyploidy Induced by Heat Shock in Channel Catfish. *Aquaculture*, 57: 362–370.
- Blaxter JHS, 1969. Development: Eggs and Larvae. *Dalam*: Hoar, W. S. dan Randall, J. H. (Eds.) *Fish Physiology*. Volume III. Academic Press Inc., New York. USA. 171–248.
- Bongers ABJ., Eding EH, dan Richter CJJ, 1993. Androgenesis in Common Carp, *Cyprinus carpio* L. *Dalam*: Penman, D., Roongratri, N. dan McAndrew, B. (Eds.) *Genetics in Aquaculture and Fisheries Management*. AADCP Workshop Proceedings. University of Stirling, Scotland. 73–76.
- Carman O, Oshiro T, dan Takashima F, 1991. Estimation of Effective Condition for Induction of Triploidy in Goldfish, *Carassius auratus* Linnaeus. *Journal of The Tokyo University of Fisheries*, 78 (2): 127–135.
- Carman O, Oshiro T, dan Takashima F, 1992. Variation in The Maximum Number of Nucleoli in Diploid and Triploid Common Carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12). *Formerly Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*: 2303–2309.
- Don J, dan Avtalion RR, 1986. The Induction of Triploidy in *Oreochromis aureus* by Heat Shock. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 186–192.
- Effendie MI, 1997. Biologi Perikanan. Yayasan Pustaka Nusantara, Yogyakarta. 50–71.
- Gervai J, Marian T, Krasznai Z, Nagy A, dan Csanyi V, 1980. Occurrence of Aneuploidy in Radiation Gynogenesis of Carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 16: 435–439.
- Gustiano R, Hardjamulia A, Subagyo dan Dharma L, 1990. Gynogenesis Meiotik II dengan Kejutan Panas pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin Penelitian Perikanan Darat*, 9(2): 56–61.
- Hardjamulia A, 1979. Budidaya Perikanan. Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.), Ikan Tawes (*Punctius javanicus* Blkr.) dan Ikan Nilem (*Osteoschilus hasselti*). SUPM Bogor. Badan Pendidikan Latihan Pertanian dan Penyuluhan Pertanian, Departemen Pertanian. 1–7.
- Howell WM, dan Black DA, 1980. Controlled Silver Staining of Nucleolus Organizer Regions with Protective Colloidal Developer: a 1 - Step Methods. *Experientia*, 36: 1014–1015.
- Hussain MG, 1996. Advances in Chromosome Engineering Research in Fish: Review of Methods, Achievements and Applications. *Asian Fisheries Science*, 9: 45–60.
- Johnstone R, 1993. Optimisation of Ploidy Manipulation Procedures. *Dalam*: Penman, D., Roongratri, N. dan McAndrew, B. (Eds.) *Genetics in Aquaculture and Fisheries Management*. AADCP Workshop Proceedings. University of Stirling, Scotland. 37–40.
- Komen J, 1990. Clones of Common Carp, *Cyprinus carpio*. New Perspectives in Fish Research. Thesis. Agricultural University. Wageningen. 1–44.
- Komen J, Bongers ABJ, Richter, CJJ, van Muiswinkel WB, dan Huisman EA, 1990. Gynogenesis in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) II: The Production of Homozygous Gynogenetic Clones and F₁ Hybrids. *Dalam*: Komen J. (Eds.) *Clones of Common Carp, Cyprinus carpio*. New Perspectives in Fish Research. Agricultural University, Wageningen. 61–81.
- Lukman R, 1991. Pengaruh Saat Awal Kejutan Panas terhadap Keberhasilan Diploidisasi pada Saat Mitosis Pertama dalam Gynogenesis Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). Skripsi. Fakultas Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 67.
- Mair GC, 1993. Chromosome-Set Manipulation in Tilapia – Techniques, Problems and Prospects. *Aquaculture*, 111: 227–244.
- Minrong C, Xinqi Y, Xiaomu Y, Hanqin L, Yonglan Y, Kang Y, Peilin L, dan Hongxi, C, 1993. Heterogenetic Tetraploids from A Cross of Japanese Phytophagous Crucian Carp Females (*Carassius auratus* cuvieri) and Red Crucian Carp Males (*Carassius auratus* red var.). *Aquaculture*, 111: 317–318.
- Pandian TJ, dan Varadaraj K, 1988. Techniques for Producing All Male and All Triploid *Oreochromis mossambicus*. *Dalam*: Pullin RSV, Bhukaswan T, Tongthai K, dan Maclean J, (Eds.) *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. ICLARM. Conference Proceedings 15. Departement of Fisheries Bangkok Thailand and International Center for Living Aquatic Resources Management Manila Philippines. 243–249.
- Pandian, TJ, dan Varadaraj K, 1990. Techniques to Produce 100% Male Tilapia. *NAGA, The ICLARM Quarterly*, 13(34): 3–5.
- Prastowo WP, 1994. Optimalisasi Waktu Kejutan Panas pada Gynogenesis Meiosis Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 75.
- Purdom CE, 1983. Genetic Engineering by The Manipulation of Chromosomes. *Aquaculture*, 33: 287–300.
- Purdom CE, 1993. Genetics and Fish Breeding. Chapman & Hall, London. 204–222.

- Richter CJJ, dan Rustidja 1985. Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan. Nuffic/ Unibraw/Luw/Fish. Malang. 69–71.
- Rustidja, 1991. Aplikasi Manipulasi Kromosom pada Program Pembenhian Ikan. Makalah dalam Konggres Ilmu Pengetahuan Nasional V. Jakarta. 23.
- Rustidja, 1993. Triploidy and Growth Performance in the Asian Catfish, *Clarias batrachus* (Abstract) *Dalam: Dodson JJ, Soewardi K, Phang VPE, Enriquez G, Na-Nakorn U, dan Sukimin S, (Eds.) Proceedings of the Symposium on Fish Genetics and Its Application to Aquaculture and Fishery Management.* Seameo Biotrop. Bogor. 59.
- Rustidja, Sukkel M, Richter CJJ, Sumawidjaja K, dan Huisman EA, 1993. Triploidy and Growth Performance in the Asian Catfish, *Clarias batrachus* L. *Dalam: Penman D, Roongratri N, dan McAndrew B, (Eds.) Genetics in Aquaculture and Fisheries Management.* AADCP Workshop Proceedings. University of Stirling, Scotland. 145–150.
- Santiago LP, Penman DJ, Myers J, Powell S, Roongratri N, Suwannarak C, dan Johnstone R, 1993. Triploidy Induction in Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using Nitrous Oxide. *Dalam: Penman D, Roongratri N, dan McAndrew B, (Eds.) Genetics in Aquaculture and Fisheries Management.* AADCP Workshop Proceedings. University of Stirling, Scotland. 151–153.
- Shepherd CJ, dan Bromage NR, 1996. Intensive Fish Farming. Great Britain by Hartnolls Ltd. Bodman, Cornwall. 145–149.
- Sumantadinata K, 1991. Teknologi Produksi Benih Unggul Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). Fenotip Generasi Pertama Beberapa Strain Ikan Mas Hasil Pemurnian dengan Metode Gynogenesis. Fakultas Perikanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 47.
- Tave D, 1993. Genetics for Fish Hatchery Managers. Avi. Publ. Co. Inc, Wesport Connecticut. 267–304.
- Thorgaard GH, 1983. Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish. *Dalam: Hoar WS, Randall DJ, dan Donaldson EM, (Eds.) Fish Physiology.* Volume IX. Part B. Academic Press Inc, New York. USA. 405–434.
- Thorgaard GH, 1992. Application of Genetic Technologies to Rainbow Trout. *Aquaculture*, 100: 85–97.
- Triwahyudi M, 1994. Optimalisasi Waktu Kejutan Panas pada Gynogenesis Mitosis Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn.). Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 72.
- Woyanarovich E, dan Horvath L, 1980. The Artificial Propagation of Warmwater Finfishes. A Manual for Extension. FAO. 65–72.
- Yamazaki F, 1983. Sex Control and Manipulation in Fish. *Aquaculture*, 33: 329–354.
- Yatim W, 1990. Reproduksi dan Embriologi. Penerbit Tarsito, Bandung. 17–18.

Reviewer: **Prof. Dr. Komar S., MSc.**