



**INDUKSI KEJUTAN SUHU 36⁰ C TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO
DAN KEBERHASILAN POLIPLIROIDISASI KATAK
(*Rana cancrivora*)**

Ria Kasmeri¹⁾, Elza Safitri²⁾

^{1,2)}Program Studi Pendidikan Biologi STKIP PGRI Sumatera Barat
elza.safitri@gmail.com

INFO ARTIKEL

Diterima : 13/03/2014
Disetujui : 30/05/2014

Kata Kunci:

*Kejutuan suhu,
Poliplioidisasi, Rana
cancrivora*

Keywords:

*Temperature Shock,
poliplioidisation, Rana
cancrivora*

Abstrak

Poliplioidi pada katak Rana cancrivora dapat dilakukan dengan memberikan kejutan suhu. Hal yang perlu diperhatikan dalam perlakuan kejutan suhu pada telur adalah waktu awal kejutan, suhu kejutan dan lama kejutan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menguji pengaruh kejutan suhu 36⁰C terhadap perkembangan embrio, dan keberhasilan poliplioidisasi katak R. cancrivora. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi STKIP PGRI Sumatera Barat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kejutan suhu 36⁰ C pada telur yang fertilisasi memberikan pengaruh terhadap perkembangan embrio katak R. cancrivora yaitu pada perlakuan D (45 menit setelah fertilisasi). Namun pemberian kejutan suhu 36⁰C tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap keberhasilan poliplioidisasi katak R. cancrivora.

Abstract

Polyploidy in the frog Rana cancrivora can be done by providing a temperature shock. The thing need to consider in treatment temperature shock at the egg is the beginning of a shock, temperature of shock and duration of shock. The research aims to identify and test the effect of temperature shock 36⁰C to the development of the embryo, and the success of poliplioidisation of frog R. Cancrivora. The research was conducted in Biology Laboratory STKIP PGRI West Sumatra. The results shows that administration of 36⁰C temperature shock on egg fertilization influences on the development of frog embryos R. Cancrivora i.e. on the treatment D (45 minutes after fertilization). Yet, the temperature shock is 36⁰C does not show any influence on the success of poliplioidisation of frog R. Cancrivora.

PENDAHULUAN

Amphibi memiliki berbagai peranan penting bagi kehidupan manusia, yakni peranan ekologis maupun ekonomis. Amphibi memakan serangga sehingga dapat membantu keseimbangan ekosistem terutama dalam pengendalian populasi serangga. Selain itu, amphibi juga dapat berfungsi sebagai *bio-indikator* bagi kondisi lingkungan karena amphibi memiliki respon terhadap perubahan lingkungan. Peranan amphibi dari segi ekonomis dapat ditinjau dari pemanfaatan amfibi untuk kepentingan konsumsi.

Katak juga memiliki kandungan protein yang tinggi sebesar 16,4 gram per 100 gram daging katak. Selain itu katak juga mengandung serat, mineral dan vitamin yang tinggi (Susilo dan Rahmat, 2010). Karena adanya kelebihan dari katak tersebut, tidak mengherankan bila permintaan katak dari negara-negara tersebut tiap tahunnya terus meningkat. Ini merupakan peluang yang sangat besar bagi negara kita untuk meningkatkan ekspor, sebagai sumber devisa Negara yang berasal dari komoditas nonmigas (Arie, 1999).

R. cancrivora merupakan satu dari lima jenis katak yang dikonsumsi di Indonesia. Katak ini juga banyak dijumpai di Sumatera Barat. Kelebihan katak ini diantaranya daging katak mengandung protein hewani yang cukup tinggi, limbah katak yang tidak dipakai sebagai bahan makanan manusia dapat dipakai untuk ransum binatang ternak, seperti itik dan ayam. Karena banyaknya kelebihan katak tersebut, sekarang ini populasi katak di alam sudah menurun. Untuk mengatasi hal tersebut sudah dilakukan budidaya katak, namun ada beberapa kendala yang ditemukan diantaranya pertumbuhannya lambat, ukurannya kecil, waktu panen lama, sangat tergantung kepada alam dan

memerlukan makanan alami yang bergerak sehingga sulit dibudidayakan (Arie, 1999).

Kekurangan itu dapat diatasi dengan cara bagaimana menghasilkan individu yang ukurannya besar dan cepat pertumbuhannya. Salah satu cara manipulasi kromosom adalah dengan poliploidi. Poliploidi dapat dilakukan dengan memberi perlakuan suhu. Kejutuan suhu selain murah dan mudah, juga efisien dapat dilakukan dalam jumlah banyak (Rustidja, 1991). Komen (1990) menyatakan, suhu panas lebih efektif untuk mencegah terlepasnya *polar body* II. Pendekatan praktis untuk induksi poliploidi melalui kejutuan panas merupakan perlakuan aplikatif sesaat setelah fertilisasi (untuk induksi triploidi) atau sesaat setelah pembelahan pertama (untuk induksi tetraploidi) pada suhu *sublethal* (Mukti, 2001). Tiga hal yang perlu diperhatikan dalam perlakuan kejutuan suhu pada telur, yaitu waktu awal kejutuan, suhu kejutuan, dan lama kejutuan (Don dan Avtalion, 1986). Nilai parameter tersebut berbeda untuk setiap spesies (Pandian dan Varadaraj, 1988).

Poliploidisasi adalah suatu metoda manipulasi kromosom dari diploid (2n) menjadi jumlah kromosom yang lebih tinggi triploid, tetraploid, pentaploid dan seterusnya (Sistina, 2000).

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan adalah petridish, spatula, pipet tetes, aquarium 30x30x30cm³, lempeng kaca 15x15cm² jarum suntik, sarung tangan, pipet tetes, objek gelas, objek gelas cekung, cover gelas, hot plate, termometer suhu, mikroskop stereo, mikroskop binokuler, alat bedah, senter, saringan, gelas ukur kimia 250ml, bulu ayam, box staining, camera digital. Bahan yang digunakan adalah induk katak *R. cancrivora* jantan dan betina matang kelamin, NaCl

fisiologis 0,9%, Aceto Orcein, Kolkisin, Metylen Blue, Asam Asetat Glasial, Etanol, AgNO₃, Gelatin, Gliserin, Asam Formiat, Alkohol 96%, Aquades, minyak Imersi dan bayam (untuk pakan berudu).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebagai perlakuan adalah kejutan suhu panas 36°C selama 10 menit yang diperlakukan pada telur setelah difertilisasi dan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu :

- a. Perlakuan A: Tanpa perlakuan kejutan suhu (kontrol)
- b. Perlakuan B : Telur 15 menit setelah fertilisasi
- c. Perlakuan C : Telur 30 menit setelah fertilisasi
- d. Perlakuan D : Telur 45 menit setelah fertilisasi
- e. Perlakuan E : Telur 60 menit setelah fertilisasi

Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali ulangan dengan jumlah telur untuk tiap-tiap perlakuan adalah sebanyak 50 butir (Modifikasi dari penelitian Fischberg, 1958).

Prosedur Penelitian

Katak *Rana cancrivora* jantan dewasa dicirikan dengan adanya kantung suara berwarna coklat kemerah-merahan pada bagian leher dan katak betina dewasa dilihat dari keberadaan telur pada bagian abdomen katak (hitam pada bagian abdomen).

Hipofisasi Buatan

Katak *R. cancrivora* jantan yang telah dewasa sebanyak 20 ekor diambil kelenjar hipofisanya, kemudian hipofisa yang telah diambil ditaruh di dalam petridish yang telah diberi beberapa tetes larutan garam fisiologis (NaCl) yang telah diencerkan 10 kali. Setelah itu dilakukan pencacahan hipofisa dan setelah merata diambil beberapa ml dan

diinjeksikan ke rongga peritoneal 4 ekor katak betina dewasa yang sedang bertelur (pada bagian perut tampak adanya telur) dan katak tersebut dimasukkan ke dalam bak penetasan. Setelah 8 jam dilakukan lagi penyuntikan hipofisa ke rongga peritoneal katak dan ditaruh kembali ke dalam bak penetasan. 4 ekor katak jantan dewasa juga diberi suntikan kelenjar hipofisa untuk merangsang pematangan sel sperma. Setelah 3-4 jam dilakukan proses pengurutan atau *stripping* induk katak betina pada bagian abodomennya.

Fertilisasi Buatan

Setelah penyuntikan terhadap 4 ekor katak betina, katak betina akan mengeluarkan telurnya. Telur yang dikeluarkan ditampung dalam petridish dan diurutkan bagian perut katak betina sehingga seluruh telur bisa dikeluarkan. Disamping itu disiapkan larutan sperma dengan mencacah testis dari 4 ekor induk katak jantan dan setelah dicacah dalam petridish maka ditambahkan larutan NaCl 0,9 %. Setelah itu larutan sperma dipipet teteskan langsung diatas telur yang sudah ditampung dalam petridish (usia 0 jam fertilisasi) dan dilakukan perlakuan kejutan suhu 36°C selama 10 menit untuk masing-masing perlakuan.

Kejutan suhu

Setelah difertilisasi, petridish yang berisi telur diberi kejutan suhu dengan cara menaruhnya diatas hotplat yang berisi air dengan suhu 36°C selama 10 menit dengan masing-masing perlakuan (kontrol/ tanpa perlakuan, 15 menit setelah fertilisasi, 30 menit setelah fertilisasi, 45 menit setelah fertilisasi, 60 menit setelah fertilisasi (masing-masing perlakuan dengan jumlah telur 50 butir dan dengan 3 kali ulangan). Setelah itu telur disebarkan kedalam aquarium 30x30x30cm³ untuk pemeliharaan larva

dan diberi beberapa ml Metylen Blue untuk pencegah jamur. Selama pemeliharaan (30 hari), larva diberi pakan daun bayam yang telah direbus dan digerus. Pada akhir pemeliharaan (30 hari) dilakukan pengamatan poliploidisasi katak dengan melihat jumlah kromosom katak *R. cancrivora*.

Pengamatan Poliploidisasi

Ekor berudu dipotong kira-kira 1,5 cm dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam barulah dipotong lagi ekor berudu dan dimasukkan potongan ekor kedalam larutan kolkisin dan hipotonik (larutan garam 0,8% dan ditambah kolkisin 0,1%) selama 1 jam. Setelah itu larutan dihisap dan ditetesi dengan Aceto Orcein selama 25 menit dan barulah potongan ekor tadi diletakkan diatas objek glas dan di squash dan dilakukan penghitungan kromosom dibawah mikroskop dan difoto.

Untuk proses perifikasi poliploidi maka dilakukan juga penghitungan jumlah nukleolus katak *R. cancrivora*. Pembuatan preparat nukleolus dimulai dengan pengambilan sampel yang akan dianalisa, yaitu ekor berudu. Jaringan ekor berudu direndam dalam larutan hipotonik dengan KCl 0.075% agar sel-selnya membesar selama 60 menit dengan penggantian setiap 30 menit, lalu dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan Carnoy selama 60 menit dengan penggantian Carnoy. Kemudian jaringan diambil dan disentuhkan pada kertas tissue hingga kering lalu ditempatkan dalam gelas objek cekung dan ditambahkan 3-4 tetes asam asetat 50% lalu digoyangkan sampai terbentuk suspensi sel. Suspensi tersebut diambil dengan menggunakan pipet tetes dan ditetaskan pada gelas objek yang sebelumnya direndam dalam alkohol 70% selama minimal 2 jam yang setiap 30 menit. kemudian dipanaskan pada lempeng pemanas dengan suhu 45-

50 C. Setelah itu suspensi diisap kembali dengan cepat sehingga pada gelas objek terbentuk lingkaran dengan diameter 1-1,5 cm. Dan siap untuk proses pewarnaan.

Pewarnaan dilakukan dengan memberikan dua tetes larutan A yang dibuat dengan cara melarutkan 10 gram AgNO₃ dalam 20 ml akuades, dan satu tetes larutan B yang dibuat dengan melarutkan 2 gram gelatin dalam 50 ml air hangat dan ditambahkan 50 ml gliserin dan 20 tetes asam formiat, lalu disebarkan ke seluruh permukaan preparat. Preparat kemudian ditempatkan dalam *box staining* yang suhunya dipertahankan 40-45 C, selama dua puluh menit atau sampai warnanya berubah menjadi kuning kecoklatan. Setelah itu preparat diangkat dan dibilas dengan aquades lalu dan dikering anginkan. Bila sudah kering preparat siap diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran 400 kali.

Parameter Uji dan Analisis Data

Parameter uji adalah melihat proses dan tahap perkembangan embrio dan mencatat waktu tahap perkembangan, yang nantinya akan dibandingkan pada masing-masing perlakuan. Parameter uji yang lainnya adalah analisis ploidisasi dengan melihat jumlah kromosom katak *R. cancrivora* dan untuk perifikasi dilakukan dengan menghitung jumlah nukleolus. Analisis data dilakukan secara statistik dengan ANOVA. Bila didapatkan perbedaan yang nyata dilakukan uji lanjut DNMRT pada taraf 5%.

(Induksi Poliploid) IP

$$= \frac{\text{Jumlah katak poliploid}}{\text{Jumlah katak sampel}} \times 100\%$$

(Mukhti *et all*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Embrio

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan mulai dari bulan Agustus 2013 sampai awal Oktober 2013 telah didapatkan tahapan-tahapan perkembangan embrio katak *Rana cancrivora* pada berbagai macam perlakuan kejutan suhu 36°C pada telur yang difertilisasi. Pengaruh kejutan suhu 36°C terhadap perkembangan embrio katak *R. cancrivora* dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada tabel 1. dapat dilihat bahwa waktu yang dibutuhkan untuk perkembangan embrio katak *R. cancrivora* berbeda-beda pada masing-masing perlakuan kejutan suhu 36°C. Perlakuan yang menunjukkan waktu yang paling cepat untuk proses perkembangan embrio katak *R. cancrivora* adalah pada perlakuan D (45 menit setelah fertilisasi) sedangkan pada perlakuan B, perlakuan C perlakuan E dan perlakuan A (kontrol) proses perkembangan embrio berjalan lambat. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh dari kejutan suhu pada masing-masing waktu setelah fertilisasi terhadap perkembangan embrio katak *F. cancrivora*, banyaknya kuning telur dan tipe telur katak. Perkembangan embrio dipengaruhi oleh banyaknya kuning telur.

Lama pengeraman telur katak tergantung pada spesies dan beberapa faktor luar. Bila suhu rendah maka akan membuat enzim chorion tidak bekerja dan membuat embrio lama melarutkan kulit telur sehingga proses penetasan lama terjadi. Hal ini didukung oleh Effendie (2002) menyatakan faktor luar yang mempengaruhi pengeraman telur adalah suhu air. Suhu merupakan faktor penting dalam mempengaruhi proses perkembangan embrio, daya tetas telur dan kecepatan penyerapan kuning telur. (Satyani, 2007). Terbentuknya daerah *Gray crescent* merupakan awal untuk

proses pembelahan (Gambar 1A). Proses pembelahan pada telur katak *R. cancrivora* terjadi setelah 1 jam fertilisasi. Pada perlakuan D waktu yang dibutuhkan untuk pembelahan 2 adalah 1 jam namun pada perlakuan lainnya membutuhkan waktu lebih dari 1 jam. Pada proses pembelahan 1 dihasilkan 2 sel atau 2 blastomer yang sama besar pada kutub animal sedangkan pada kutub vegetal belum berlangsung proses pembelahan (Gambar 1B), hal ini disebabkan oleh banyaknya yolk yang terdapat pada kutub vegetal dari telur katak. Pada proses pembelahan ke 2 merupakan proses pembelahan menghasilkan 4 sel/blastomer (Gambar 1 C). Pada perlakuan D waktu yang dibutuhkan untuk mencapai pembelahan 4 sel adalah 1 jam, sedangkan pada perlakuan lain lebih lambat dari perlakuan D.

Setelah tahapan blastula maka embrio memasuki tahapan selanjutnya yaitu tahapan Gastrula. Pada perlakuan D embrio katak *R. cancrivora* membutuhkan waktu 9 jam untuk mencapai tahap gastrula. Gastrula pada embrio katak dimulai dari sisi dorsal embrio dan pada daerah ini terbentuk celah blastoporus (Gambar 2 A). Akhir dari tahap gastrulasi terbentuklah sumbat yolk (yolk plug) (Gambar 2 B).

Proses perkembangan selanjutnya adalah Neurulasi yang merupakan tahapan pembentukan bumbung saraf (neural tube). Pada perlakuan D membutuhkan waktu 10.30 jam setelah fertilisasi untuk tahap neurulasi awal dan 12 jam setelah fertilisasi untuk tahap neurula akhir. Pada perlakuan A (kontrol) membutuhkan waktu 14 jam untuk proses neurula awal dan 16,50 jam untuk proses neurula akhir.

Tahap neurula dicirikan dengan adanya penebalan pada lapisan ektoderm membentuk neural plate (Gambar 3A), kemudian membentuk neural groove dan

neural fold (Gambar 3 B) dan diakhiri dengan terbentuknya neural tube (bubungan neural) (Gambar 3 C). Menurut Lufri dan Helendra (2002) bahwa pada saat embrio memasuki tahap neurulasi terjadi penebalan ektoderm saraf pada sisi dorsal embrio. Penebalan itu berbentuk keping sehingga disebut keping saraf (neural plate). dan endoderm. Perkembangan lapisan ektoderm akan membentuk sistem saraf, otak dan mata. dengan proses pembentukan jantung dan sistem sirkulasi (Gambar 4C).

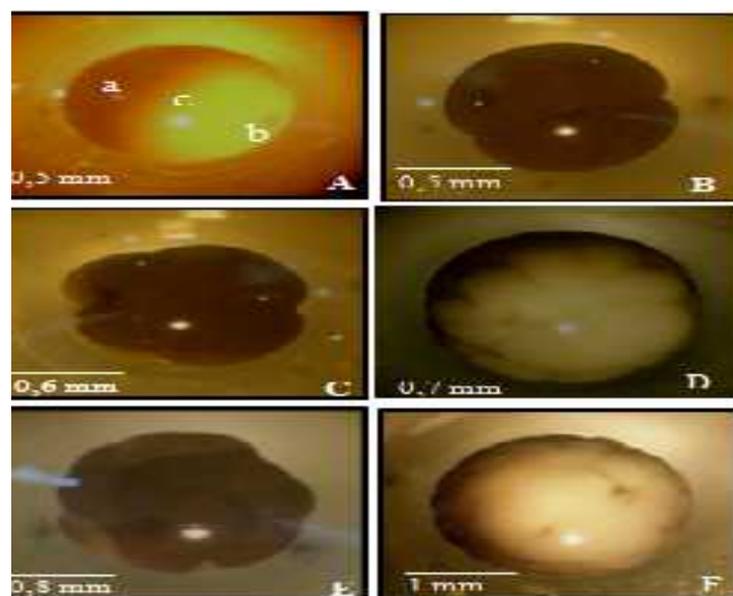
Setelah proses Neurulasi selesai maka embrio katak akan memasuki

tahap selanjutnya yaitu tahap Organogenesis. Pada tahap organogenesis (pembentukan otak) ini perlakuan yang menunjukkan proses perkembangan paling cepat masih pada perlakuan D yaitu dengan waktu 19 jam.

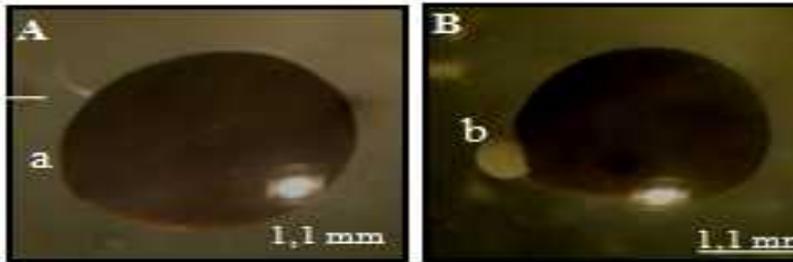
Pada tahap organogenesis terjadi proses perkembangan dari lapisan lembaga ektoderm, mesoderm dan endoderm. Perkembangan lapisan ektoderm akan membentuk sistem saraf, otak dan mata. dengan proses pembentukan jantung dan sistem sirkulasi (Gambar 4C). Induksi Ploidisasi. Poliploidisasi pada katak *R. cancrivora* dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 1. Waktu perkembangan embrio setelah diberi kejutan suhu 36⁰ C selama 10 menit

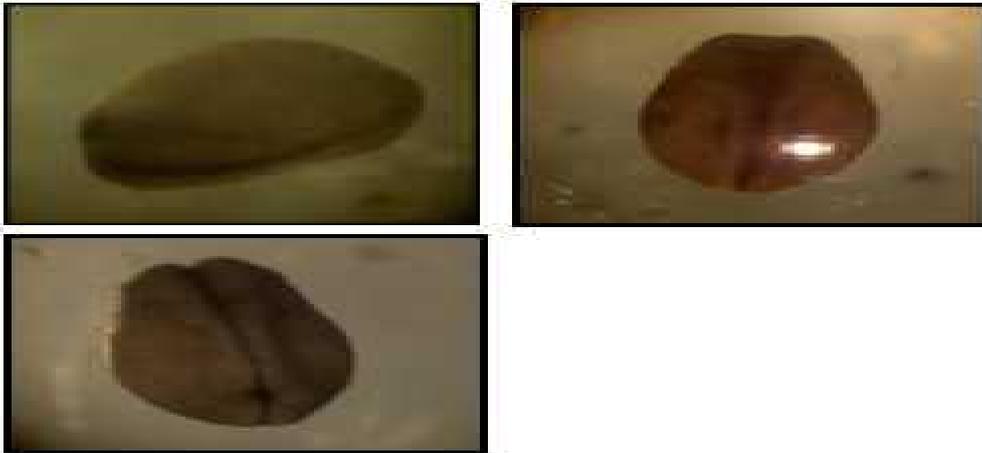
Tahapan	Waktu perkembangan (jam)				
	A	B	C	D	E
2 sel	1,30	1,10	1,18	1,00	1,27
4 sel	2,00	1,15	1,20	1,15	1,24
Morula	3,15	2,15	2,30	2,00	2,40
Blastula	8,00	6,15	6,35	6,00	7,05
Gastrula	11,00	9,17	9,45	9,00	10,00
Neurula awal	14,00	10,45	11,00	10,30	11,26
Neurula akhir	16,50	12,20	13,00	12,00	13,25
Kuncup ekor	24,00	20,00	20,40	19,00	21,33
Haching	81,00	73,00	75,20	67,30	78,30



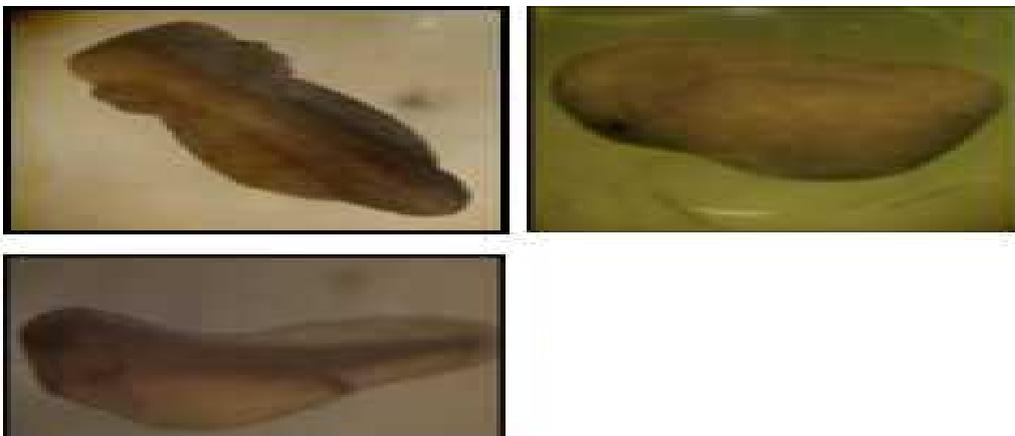
Gbr 1. Tahapan Perkembangan Embrio. A. Telur yang sudah difertilisasi. B. Tahap pembelahan 2 sel. C. Tahap pembelahan 4 sel. D. Tahap pembelahan 32 sel. E. Tahap pembelahan 64 sel (Morula). F. Tahap pembelahan 128 sel (Blastula). Ket : a (kutub animal), b (kutub vegetal), c (Gray Crescent). Perbesaran 40x10.



Gbr 2. Tahapan Gastrulasi. A. Gastrulasi awal (pembentukan bibir dorsal). B dan C Pembentukan Yolk Plug (sumbat yolk). Ket: a (bibir dorsal), b (sumbat yolk). Perbesaran 40x10.



Gbr 3. Tahapan Neurulasi. A. Pembentukan Neural Plate (keping saraf). B. Pembentukan Neural Groove (lipatan saraf). C. Pembentukan Neural Tube (bambung neural). Ket: a (penebalan ektoderm membentuk neural plate), b (neural groove), c (neural fold) dan d (neural tube). Perbesaran 40x10



Gbr 4. Tahap Organogenesis. A. Pembentukan otak dan Tail Bud awal. B dan C. Pembentukan Tail Bud akhir (Gill Sirculation dan Elongasi). Ket: a (otak primitif), b (tail bud), c (gill sirculation), d (ekor). Perbesaran 40x10

Gbr 4. Tahap Organogenesis. A. Pembentukan otak dan Tail Bud awal. B dan C. Pembentukan Tail Bud akhir (Gill Sirculation dan Elongasi). Ket: a (otak primitif), b (tail bud), c (gill sirculation), d (ekor). Perbesaran 40x10

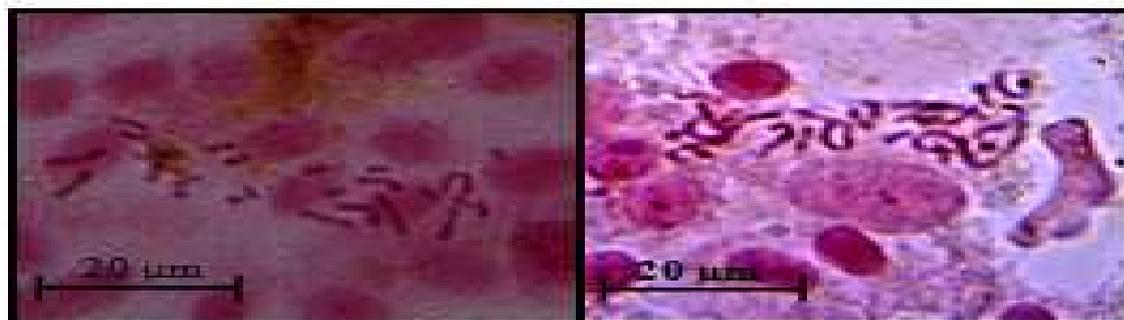
Tabel 2. Jumlah poliploidi pada katak *R. cancrivora*

Perlakuan	Ulangan	Jumlah Individu 2n	Jumlah Individu Poliploid
A	1	15	0
	2	15	0
	3	15	0
B	1	15	0
	2	15	0
	3	15	0
C	1	15	0
	2	15	0
	3	15	0
D	1	15	0
	2	15	0
	3	15	0
E	1	15	0
	2	15	0
	3	15	0

Dari tabel 2 diketahui bahwa induksi kejutan suhu 36⁰ C terhadap katak *R. cancrivora* pada waktu yang berbeda setelah fertilisasi selama 10 menit tidak satupun dari perlakuan didapatkan individu yang poliploidi. Semua individu katak *R. cancrivora* baik perlakuan B, C, D dan E tidak ada yang menunjukkan jumlah kromosom yang lebih dari 2n (diploid). Tidak ditemukannya individu katak *R. cancrivora* poliploid (triploid dan tetraploid) dikarenakan oleh waktu pemberian kejutan dan lama kejutan yang kurang tepat. Untuk individu triploid kejutan suhu diberikan agar

mampu mencegah terjadinya pelepasan polar body II, namun dari penelitian tidak didapatkan individu yang triploid.

Hal ini diduga karena waktu pemberian kejutan dan lama kejutan yang kurang tepat. Kadi (2007) menyatakan bahwa proses triploid pada ovum dimaksudkan untuk mencegah atau menahan peloncatan polar body II dari ovum. Sedangkan untuk individu tetraploid kejutan suhu diberikan untuk mampu mencegah terjadinya proses pembelahan I, namun hal ini juga tidak ditemukan karena waktu pemberian kejutan dan lama kejutan yang kurang tepat



Gambar 5. Penyebaran kromosom pada perlakuan C dan D yang memperlihatkan jumlah kromosom diploid (2n).

Dari gambar di atas terlihat bahwa jumlah kromosom pada katak *R. cancrivora* masih diploid (2n) dan tidak menunjukkan adanya jumlah kromosom yang poliploid.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian mengenai Induksi Kejutan Suhu 36°C terhadap Perkembangan Embrio dan Keberhasilan Poliploidisasi Katak *R. cancrivora* maka didapatkan kesimpulan bahwa :

Pemberian Induksi Kejutan Suhu 36°C selama 10 menit dengan waktu yang berbeda-beda setelah fertilisasi berpengaruh terhadap perkembangan embrio katak *R. cancrivora*. Semua perlakuan lebih cepat waktunya daripada perlakuan tanpa kejutan suhu (kontrol) dan yang paling cepat waktunya adalah pada perlakuan D (45 menit setelah fertilisasi).

Pemberian Induksi Kejutan Suhu 36°C tidak berpengaruh terhadap poliploidisasi katak *R. cancrivora*, karena tidak ditemukan individu yang poliploid untuk masing-masing perlakuan. Berdasarkan penelitian disarankan agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan pengamatan dari rentang waktu awal fertilisasi sampai terjadinya pembelahan pertama yaitu 1,30 jam setelah fertilisasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dari DP2M Dikti yang telah memberikan tempat pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arie, Usni. (1999). *Pembibitan dan Pembesaran Bullfrog. Penebar Swadaya*.
- Don, J., Avtalion RR. (1986). *The Induction of Triploidy in Oreochromis aureus by Heat Shock*. Theor.Appl. Genet, 72 : 186-192.
- Fischberg, M. (1958). *Experimental Tetraploidy in Newts*. Journal Embriol. Exp. Morph. Vol. 6, Part 3, pp. 393-402.
- Komen J, (1990). *Clones of Common Carp, Cyprinus carpio*. New Perspectives in Fish Research. Thesis. Agricultural University. Wageningen. 1-44.
- Mukti, A. Taufiq., Rustidja., S.B Sumitro dan M.S. Djati. (2001). *Poliploidisasi Ikan Mas (Cyprinus carpio L.). Polyploidization of Common Carp (Cyprinus carpio L.)*. BIOSAIN, Vol 1 No 1.

- Pandian TJ, dan Varadaraj K, (1990). *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.
- Rustidja, (1991). *Aplikasi Manipulasi Kromosom pada Program Pembenihan Ikan*. Makalah dalam Konggres Ilmu Pengetahuan Nasional V. Jakarta. 23.
- Rustidja. (2004). *Pemijahan Buatan Ikan-Ikan Daerah Tropis*. Bahtera Press. Malang. Hal. 91.
- Sistina, Y. (2000). *Biologi Reproduksi*, Fak. Biologi Unsoed, Pasca sarjana, Purwokerto : hal 66
- Susilo, A.B., Purwadaksi Rahmat. (2010). *Dahsyatnya Bisnis Tokek*. Penerbit : Agromedia Pustaka.