



Pengaruh Umur Zigot Pada Saat Kejutan Panas Terhadap Keberhasilan Ginogenesis Ikan Seurukan (*Osteochilus Vittatus*)

Effect of Zygote Age for Heat Shocking on The Successful of Gynogenesis of Seurukan Fish (*Osteochilus vittatus*)

Zulhardi Zulhardi*, Zainal A. Muchlisin, Syahrul Purnawan

Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Syiah Kuala Darussalam, Banda Aceh.

*Email korespondensi: zulhardi9922@gmail.com

ABSTRACT

The objectives of the present study was to determine the best age of the zygote for gynogenesis of seurukan fish (*Osteochilus vittatus*) using heat shock treatment. The completely randomized design was utilized in this study. Five levels of zygote age were tested, namely: 3 minutes, 5 minutes, 7 minutes, 9 minutes and 11 minutes after fertilization and one control treatment (without heat shock). The zygotes were shocked at the temperature of 38°C for 60 seconds and every treatment was done at three replications. The ANOVA test showed that the zygote age gave the significant effect on the triploidy level and growth performance of the seurukan fish ($P < 0.05$). The highest percentage of the triploid fish were found at zygote age of 3 minutes, but this value was not different significantly with 5 min, 7 min and 9 min. The highest weight gain was found at zygote age of 3 minutes, but this value was not different significantly with 5 min, 7 min and 9 min. In addition, the highest of length gain was also recorded at zygote at zygote age of 3 minutes, but this value was not different significantly with 5 minutes of the zygote ($P > 0.05$). It is concluded that the best zygote age of the seurukan fish for gynogenesis using heat shock treatment was 3 minutes after fertilization.

Keywords : Bonylip barb, gynogenesis, triploidy, zygote age, heat shock

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan umur zigot terbaik untuk proses ginogenesis ikan seurukan (*Osteochilus vittatus*) dengan menggunakan kejutan suhu panas. Metode yang digunakan adalah eksperimen dengan model Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal dengan enam taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan tiga kali ulangan. Kejutan suhu yang diberikan yaitu 38°C dengan lama kejutan 60 detik, dengan perlakuan yaitu: kontrol (tanpa perlakuan kejutan panas), umur zigot 3 menit setelah pembuahan, umur zigot 7 menit setelah pembuahan, umur zigot 9 menit setelah pembuahan dan 11 menit setelah pembuahan. Uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian kejutan suhu panas pada umur zigot yang berbeda berpengaruh nyata terhadap triploidy dan pertumbuhan ikan seurukan ($P < 0,05$). Persentase ikan triploid tertinggi dijumpai pada perlakuan 3 menit setelah pembuahan, nilai tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5 menit, 7 menit dan 9 menit. Pertambahan bobot tertinggi dijumpai pada umur zigot 3 menit setelah pembuahan, nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5 menit, 7 menit dan 9 menit. Pertambahan panjang tertinggi dijumpai pada perlakuan 3 menit setelah pembuahan, nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5 menit ($P < 0,05$). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa umur zigot yang berbeda berpengaruh terhadap triploidy, dan umur zigot terbaik adalah 3 menit setelah pembuahan.

Kata kunci: Ikan nilem, ginogenesis, triploidisasi, umur zigot, kejutan suhu panas



PENDAHULUAN

Ikan seurukan atau lebih dikenal dengan ikan nilem (*Osteochilus vittatus*) merupakan salah satu komoditas ikan tawar yang memiliki potensi ekonomis (Muchlisin, 2013). Ikan seurukan memiliki keunggulan antara lain mudah dibudidayakan karena tahan terhadap serangan penyakit (Subagja *et al.*, 2006), di alam ikan ini mengkonsumsi alga, lumut dan tumbuhan yang menempel pada benda-benda yang mengapung sehingga tergolong sebagai ikan herbivora (Samsudin, 2010). Ikan seurukan memiliki satu ciri khas khusus yaitu memiliki bibir yang tebal dan ditutupi oleh lipatan-lipatan yang memanjang (*plicae*) dan memiliki sejumlah proyeksi keratin seluler atau disebut unculi (Hadiaty, 2000).

Penelitian tentang ikan *O. vittatus* telah banyak dilakukan diantaranya tentang aspek reproduksinya di perairan Rawa Pening Kecamatan Tuntang Kabupaten Semarang (Rochmatin *et al.*, 2014), pemijahan (Muchlisin *et al.* 2014; Adami *et al.*, 2015), kebutuhan protein yang optimum (Samsudin *et al.*, 2010), kebutuhan ransum harian (Asma *et al.*, 2016), pemanfaatan ekstrak bawang merah, *Allium cepa* dalam pakan sebagai sumber prebiotik (Mayana *et al.*, 2016), perkembangan post-larva dengan pemberian pakan berbeda (Yusuf *et al.*, 2014), dan karakteristik genetik enam populasi *O. hasselti* di Jawa Barat (Mulyasari *et al.*, 2010).

Saat ini budidaya ikan seurukan sebagian besar masih dilakukan secara tradisional baik pembenihan maupun pembesaran (Samsudin *et al.*, 2010). Selain itu, ikan seurukan juga memiliki pertumbuhan yang relatif lambat sehingga hasil produksinya rendah. Beberapa usaha telah dilakukan dalam upaya percepatan pertumbuhan diantaranya melalui aplikasi prebiotik (Mayana *et al.*, 2016), dan pemberian pakan dengan kadar protein yang optimum (Yusuf *et al.*, 2014), namun hasilnya belum memuaskan. Untuk mengartisipasi hal tersebut maka diperlukan aplikasi teknologi rekayasa genetik salah satunya melalui ginogenesis.

Menurut Edriani *et al.* (2009), rekayasa genetik merupakan salah satu cara untuk meningkatkan kualitas organisme sesuai dengan yang diharapkan. Salah satu metode yang berkembang saat ini adalah metode ginogenesis (Tamam, 2011). Teknik ginogenesis dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya pemberian radiasi untuk menonaktifkan sperma, pemberian kejutan suhu panas atau dingin (Tamam, 2011; Febrianto, 2011). Menurut Sambara (1898), perlakuan ginogenesis dapat dilakukan pada beberapa tahap perkembangan embrio atau zigot yaitu pada saat pembuahan dan awal perkembangan embrio.

Ginogenesis kejutan suhu telah dilakukan pada beberapa spesies ikan diantaranya ikan mas, *Cyprinus carpio* (Holleberg *et al.*, 1986), *Cyprinus carpio* (Mukti, 2005), *Pangasius sp.* (Siswanto, 2009), *Clarias batrachus* (Sukarti *et al.*, 2006), *Clarias gariepinus* (Sumbodo, 2009) dan *Osteochilus hasselti* (Setiadi, 2009). Hasil penelitian terdahulu terhadap ginogenesis ikan seurukan dengan pemberian kejutan suhu panas 40°C selama 90 detik memberikan hasil terbaik berbanding suhu lainnya (Sambara, 1989), namun dalam penelitian tersebut pengaruh umur zigot tidak diteliti. Oleh karena itu penelitian ini penting dilakukan untuk melengkapi informasi ginogenesis pada ikan seurukan yang telah ada. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan umur zigot terbaik untuk proses ginogenesis dengan menggunakan kejutan suhu panas.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Unit Pelaksana Teknis Budidaya Air Tawar (UPTD-BAT) Jantho Baru, Aceh Besar dan Laboratorium FMIPA Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh pada tanggal 19 Juni sampai 19 Agustus 2015.



Rancangan Percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan enam taraf perlakuan, masing-masing perlakuan dengan tiga kali pengulangan. Kejutan suhu panas yang diberikan yaitu 38°C dengan lama kejutan 60 detik, dengan perlakuan adalah sebagai berikut :

P1 : Tidak diberikan kejut panas (Kontrol)

P2 : Pemberian kejut panas pada umur zigot 3 menit

P3 : Pemberian kejut panas pada umur zigot 5 menit

P4 : Pemberian kejut panas pada umur zigot 7 menit

P5 : Pemberian kejut panas pada umur zigot 9 menit

P6 : Pemberian kejut panas pada umur zigot 11 menit

Persiapan wadah

Mangkuk plastik yang digunakan harus dicuci terlebih dahulu, kemudian diisi dengan air hingga 800 ml dan diberi aerasi untuk mensuplai oksigen. Akuarium yang digunakan juga dicuci terlebih dahulu dan diisi air 40 liter. Pada wadah pembuahan dimasukkan saringan untuk mempermudah pemindahan telur dari wadah pembuahan ke wadah perlakuan, sedangkan pada wadah perlakuan diatur suhu dengan menggunakan pemanas (*heater*).

Koleksi telur dan sperma ikan

Ikan seurukan betina disuntik menggunakan *Ovaprim* 0,5 cc/kg ikan. Ikan disuntik pada bagian punggung sebelah kiri atau sebelah kanan sirip dorsal dan dikembangkan kedalam kolam induk. Setelah 6 jam dilakukan pengurutan untuk memperoleh telur. Telur ditampung pada baskom plastik kering dan ditempatkan dalam *ice box* pada suhu 4°C.

Sperma ikan seurukan diperoleh dengan cara mengurut ikan seurukan jantan yang sudah matang gonad. Pengurutan sperma ikan seurukan dilakukan di bagian perut ke arah lubang genital sehingga cairan yang berwarna putih keluar (sperma) dan diambil dengan menggunakan alat sedotan (alat suntik) kemudian ditempatkan dalam *ice box* pada suhu 4°C.

Proses Triploidisasi

Sperma dan telur dicampurkan dalam mangkuk plastik dan dibiarkan selama 3 menit supaya proses fertilisasi dapat berlangsung dengan sempurna. Telur yang telah terbuahi ditebar diatas jaring yang telah ditempatkan dalam wadah penetasan pada suhu normal air (27°C-28°C), diusakan tidak ada telur yang berleketan. Kemudian pemberian kejutan suhu panas (*heat shock*), dengan cara memindahkan jaring yang berisi telur kedalam *box shocking* (suhu air 38°C) pada umur zigot 3,5,6,7,9 dan 11 menit setelah pembuahan dengan lama kejutan 60 detik. Selanjutnya saringan diangkat dan diinkubasi dalam mangkuk plastik pada suhu 27-28 °C dan diberikan larutan *methylen blue* untuk mencegah serangan jamur, perlakuan dilakukan secara bertahap.

Pengamatan Sel Darah Merah

Keberhasilan triploidi diamati berdasarkan ukuran sel darah merah, dimana ikan triploid memiliki ukuran sel darah merah lebih besar berbanding ikan normal. Untuk tujuan tersebut, telur yang menetas menjadi larva dipelihara selama 15 hari, kemudian larva ikan diambil kemudian ditusuk pada bagian ekor harus tepat pada saluran pembuluh darahnya. Kemudian darah diambil dioleskan pada gelas objek kemudian difiksasi dengan metanol selama 2 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan sel darah merah dengan menggunakan larutan giemsa 10%



selama 15 menit. Setelah kering, gelas objek tersebut diangkat dan dicuci dengan menggunakan air suling secara terbalik dan hati-hati agar sel darah tidak terlepas dari gelas objek. Sebanyak 10-15 sel darah diukur secara acak pada masing-masing unit percubaan. Selain mengukur sel darah merah, panjang dan bobot larva ikan juga diukur untuk membandingkan antar perlakuan

Analisis Data

Data yang diperoleh di uji Sidik Ragam (Analisis Varian, ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95% dengan menggunakan Software SPSS ver. 17.0, dan jika ditemukan adanya pengaruh dilakukan uji lanjut Duncan untuk mengetahui perlakuan terbaik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian kejutan suhu panas pada umur zigot yang berbeda berpengaruh nyata terhadap triploidisasi dan pertumbuhan ikan seurukan ($P < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertambahan panjang, tertinggi dijumpai pada perlakuan 3 menit setelah pembuahan, nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5 menit ($P < 0,05$). Pertumbuhan tertinggi juga dijumpai pada perlakuan 3 menit setelah pembuahan, nilai tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5,7 dan 9 menit. Persentase ikan yang triploid tertinggi juga dijumpai pada perlakuan 3 menit setelah pembuahan, nilai ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan 5,7 dan 9 menit. Namun pada perlakuan kontrol tidak terdapat ikan triploid sama sekali. Secara umum terlihat bahwa persentase jumlah ikan triploid menurun seiring dengan peningkatan umur zigot yang diberikan kejut suhu panas (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai rerata dan standar deviasi (\pm SD) persentase triploidisasi, pertambahan bobot dan pertambahan panjang dengan kejutan panas pada umur zigot yang berbeda.

Perlakuan	Persentase triploid (%)	Pertambahan panjang (cm)	Pertambahan bobot (mg)
Kontrol	0	2,00 \pm 0,02 ^a	120,66 \pm 0,01 ^a
3 Menit	83,33 \pm 37,90 ^c	2,33 \pm 0,02 ^d	181,33 \pm 0,02 ^c
5 Menit	76,66 \pm 43,01 ^{bc}	2,27 \pm 0,03 ^{cd}	178,66 \pm 0,02 ^{bc}
7 Menit	73,33 \pm 44,98 ^{bc}	2,24 \pm 0,02 ^{bc}	177,33 \pm 0,01 ^{bc}
9 Menit	66,66 \pm 47,94 ^{bc}	2,19 \pm 0,04 ^b	173,33 \pm 0,01 ^{bc}
11 Menit	60,00 \pm 49,82 ^b	2,20 \pm 0,04 ^b	170,66 \pm 0,01 ^b

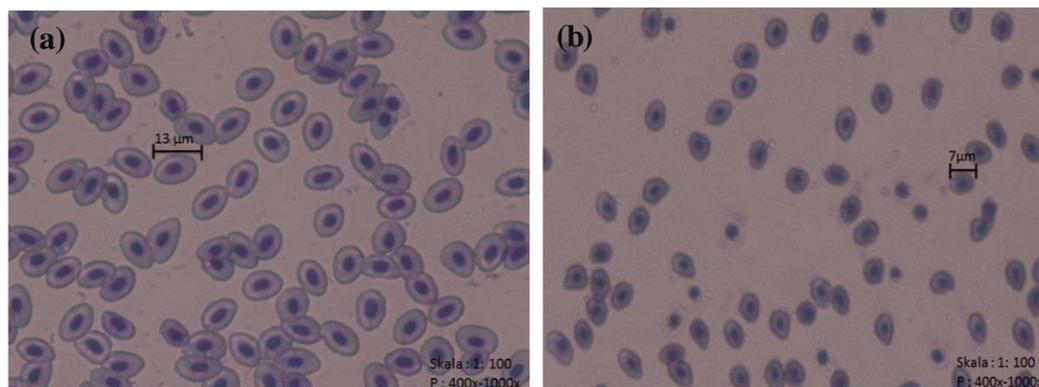
Nilai rerata (\pm SD) pada kolom yang sama diikuti dengan superscript yang sama adalah tidak berbeda nyata ($P > 0,05$)

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase triploidisasi semakin tinggi jika dilakukan pada umur lebih awal setelah fertilisasi. Menurut Pudjirahaju *et al.* (2008), pemberian kejutan suhu panas sebaiknya sebelum meiosis kedua dan sebelum terjadi pelepasan polar body II. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hollobecq *et al.* (1986), bahwa untuk meningkatkan

persentase ikan ginogenesis sebaiknya kejutan suhu diberikan sesaat setelah pembuahan, yaitu pada meiosis dan mitosis pertama. Menurut Siraj *et al.* (1993), keberhasilan ginogenesis triploid selain dipengaruhi oleh kejutan awal juga dipengaruhi oleh tinggi rendahnya suhu yang diberikan dan lamanya waktu kejutan.

Untuk mengetahui keberhasilan ginogenesis dilakukan pengukuran sel darah merah (eritrosit). Menurut Sastrawibawa (2003), pewarnaan sel darah merah menggunakan larutan giemsa 10% selama 20 menit pada suhu kamar, dengan pembesaran mikroskop cahaya 400x dan 1000x, terlihat sel darah merah ikan triploid lebih besar daripada sel darah ikan yang normal. Menurut Carman (1992), pengamatan sel darah merah dilakukan dengan asumsi apabila bertambahnya jumlah set kromosom akan memperbesar sel darah merah sehingga dapat dibedakan diameter sel darah ikan triploid dengan sel darah merah ikan yang normal. Hasil pengukuran sel darah merah pada ikan seurukan triploid (perlakuan) memiliki kisaran diameter sel darah merah $>9 \mu\text{m}$ sedangkan ikan normal (kontrol) memiliki diameter sel darah merah $<9 \mu\text{m}$ (Gambar 1 dan Tabel 2).



Gambar 1. Penampakan sel darah merah ikan seurukan (a) sel darah merah ikan triploid, (b) diameter sel darah ikan normal

Tabel 2. Rata-rata ukuran sel darah merah berdasarkan perlakuan

Ulangan	Perlakuan (menit setelah pembuahan)					
	P1 Kontrol	P2 3 Menit	P3 5 Menit	P4 7 Menit	P5 9 Menit	P6 11 Menit
1	6,9 μm	11,7 μm	11,4 μm	11,6 μm	10,6 μm	10,4 μm
2	6,8 μm	11,1 μm	10,9 μm	10,2 μm	10,9 μm	9,8 μm
3	6,7 μm	12,1 μm	11,1 μm	10,6 μm	10,6 μm	10,3 μm
Rerata	6,80 μm	11,63 μm	11,13 μm	10,8 μm	10,7 μm	10,17 μm

Berdasarkan hasil pengamatan sel darah merah pada ikan seurukan didapatkan hasil bahwa pada perlakuan kontrol (P1) yaitu berkisar 6,7 – 6,9 μm , sedangkan pada perlakuan kejutan panas dengan lama kejutan 60 detik hasil rata-rata ikan triploid secara berturut-turut yaitu P2 berkisar 11,1 – 12,1 μm , P3 berkisar 10,9 – 11,4 μm , P4 berkisar 10,2 – 10,6 μm , P5 berkisar



10,6 – 10,9 μm dan P6 berkisar 9,8 – 10,6 μm . Berdasarkan data pengamatan hasil deteksi triploid terlihat pada perlakuan kontrol (P1) tidak terdapat ikan yang bersifat triploid (0%). Ikan triploid hanya dijumpai pada zigot yang diberikan kejutan suhu panas saja, yaitu berkisar 60 – 83% (Tabel 2).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan kejutan suhu panas 3 menit setelah pembuahan menghasilkan ikan triploid tertinggi, sedangkan pada perlakuan 11 menit setelah pembuahan adalah persentase terendah. Hal ini diduga pemberian kejutan suhu panas mempengaruhi kelangsungan hidup embrio ikan, namun mempunyai peluang lebih besar untuk menghasilkan keturunan-keturunan yang triploid (Sukarti *et al.*, 2006). Hal ini mungkin disebabkan karena beberapa larva yang dihasilkan dari proses ginogenesis ini mengalami kecacatan sehingga menghambat dalam proses memanfaatkan makanan dan akhirnya mengalami kematian (Hussain, 1998).

Hasil penelitian juga menunjukkan pertumbuhan ikan triploid lebih cepat berbanding ikan normal, pada ikan normal diperoleh bobot rata-rata ikan 120,66 mg setelah 15 hari, angka ini meningkat menjadi 170,66 mg – 181,33 mg dengan penambahan panjang rata-rata ikan 2,00 cm setelah 15 hari, angka ini juga meningkat menjadi 2,19 cm – 2,32 cm pada ikan triploid. Dengan demikian menunjukkan bahwa ikan triploid dengan kejutan panas dapat meningkatkan pertumbuhan ikan. Semakin tinggi jumlah ikan yang bersifat triploid pada populasi ikan seurukan maka akan semakin meningkat rata-rata laju pertumbuhan pada ikan secara keseluruhan sebagaimana yang terlihat pada penelitian ini

KESIMPULAN

Perbedaan umur zigot mempengaruhi tingkat keberhasilan ginogenesis (triploidi) ikan seurukan, dimana tingkat triploidi tertinggi diperoleh pada umur zigot 3 menit setelah pembuahan, sedangkan nilai terendah diperoleh pada perlakuan umur zigot 11 menit setelah pembuahan. Pertumbuhan ikan triploid cepat berbanding ikan yang diploid (normal). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa umur zigot terbaik adalah 3 menit setelah pembuahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adami, Y., N. Fadli, N. Nurfadillah, K. Eriani K., Z. Jalil, Z.A. Muchlisin. 2016. A preliminary observation on the effect of sperm extenders on the fertilization and hatching rates of seurukan fish (*Osteochilus vittatus*) eggs. *AAFL Bioflux*, 9(2):300-304
- Asma, N., Z. A. Muchlisin, I. Hasri. 2016. Pertumbuhan dan kelangsungan hidup benih ikan peres (*Osteochilus vittatus*) pada ransum harian yang berbeda. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikanan Unsyiah*, 1(1): 1-11.
- Carman, O., T. Oshiro, F. Takashima. 1992. Variation in the maximum number of nucleoli in diploid and triploid common carp. *Journal Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12):2303-2309.
- Edriani, G., D. Silmina, W. Afrilasari. 2009. Pengaruh lama kejutan suhu terhadap keberhasilan teknik triploidisasi pada ikan komet (*Carrasius auratus*). Fakultas Kelautan dan Perikanan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Febrianto. 2011. Triploidisasi ikan nilam (*Osteochilus hasselti*) dengan menggunakan tingkat kejutan panas dan lama perendaman berbeda. Skripsi, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Hadiaty, R.N. 2000. Beberapa catatan tentang aspek pertumbuhan, makan dan reproduksi ikan nilam paitan (*Osteochilus jeruk* Hadiaty & Siebert, 1998). *Jurnal Lembaga Pengetahuan Ilmu Indonesia*, 5(2): 151-156.
- Hollobeck, M.G., D. Chourrout, G. Wohifarth, R. Billard. 1986. Diploid gynogenesis induced by heat shock after activation with UV-irradiated sperm in common carp. *Aquaculture*, 54 : 69-76.



- Hussain, M.G. 1998. Manipulation of chromosomes in fish : review of various techniques and their implications in aquaculture. *Journal Fisheries Rerearch*, 2(1):99-108.
- Mayana, M., Z. A. Muchlisin, I. Dewiyanti. 2016. Pemanfaatan ekstrak bawang merah (*Allium cepa*) dalam pakan sebagai sumber prebiotik untuk benih ikan seurukan (*Osteochilus vittatus*). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikan Unsyiah*, 1(1): 25-34.
- Muchlisin, Z.A. 2013. Potency of freshwater fishes in Aceh waters as a basis for aquaculture development program. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 13(1): 91-96.
- Muchlisin, Z. A., G. Arfandi, M. Adlim, N. Fadli. 2014. Induced spawning of seurukan fish, *Osteochilus vittatus* (Pisces: Cyprinidae) using ovaprim, oxytocin dan chicken pituitary gland extrats. *AACL Bioflux*, 7(5): 412-418.
- Mukti, A.T. 2005. Perbedaan keberhasilan tingkat poliploidisasi ikan mas (*Cyprinus carpio* Linn) melalui kejutan panas. *Berkala Penelitian Hayati*, 10: 133-138.
- Pudjirahaju, A., Rustidja, S.B. Sumitro. 2008. Penulusuran geneotipe ikan mas (*Cyprinus carpio* L) strain punten gynogenetik. *Jurnal Ilmu-ilmu dan Perikanan Indonesia*, 15(1):13-19.
- Rochmatin, S.Y., A. Solichin, S. W. Saputra. 2014. Aspek pertumbuhan dan reproduksi ikan nilam (*Osteochilus hasselti*) di perairan Rawa Pening Kecamatan Tuntang Kabupaten Semarang. *Diponegoro Journal of Maquares*, 3(3): 153-159.
- Sambara, S. 1989. Keberhasilan penggunaan sperma ikan nilam (*Osteochilus hasselti* CV) pada ginogenesis ikan mas (*Cyprinus carpio* L). Karya Ilmiah, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Samsudin, R., N. Suhenda, M. Sulhi. 2010. Evaluasi penggunaan pakan dengan kadar protein berbeda terhadap pertumbuhan benih ikan nilam (*Osteochilus hasselti*). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, 697-701.
- Sastrawibawa, S. 2003. Jumlah kromosom dan anak inti ikan tawes diploid (*Puntius gonionotus* Blkr). *Jurnal Bionatura*, 5(1):21-28.
- Setiadi, I. 2000. Perkembangan telur ikan nilam (*Osteochillus hasselti* C.V.) yang dikejut panaskan sebagai upaya pengadaan ikan nilam triploid. Skripsi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
- Siraj, S.S., S. Seki, A.K. Jee, Y. Yamada, N. Taniguchi. 1993. Diploid Gynogenesis in lampam jawa (*Puntius gonionotus*) using uv irradiated sperm of (*Puntius schwanenfeldii*) followed by temperature shock. *Journal Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(6):957-965.
- Siswanto, F. A. 2009. Lama penerapan kejutan panas terhadap keberhasilan triploidisasi ikan patin (*Pangasius* sp). Skripsi, Fakultas Sains Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Subagja, J., R. Gustiano, L. Winarlin. 2006. Pelestarian ikan nilam (*Osteochilus hasselti* C.V) melalui teknologi pembenihannya. *Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumber Daya Genetik di Indonesia: Manfaat Ekonomi untuk Mewujudkan Ketahanan Nasional*, 279-286 pp.
- Sukarti, K., I. Djawat. dan Y. Fujaya. 2006. Pengaruh Lama Kejutan Panas Terhadap Keberhasilan Triploidisasi Ikan Lele (*Clarias batrachus*). *Jurnal Sains dan Teknologi*, 6 (3): 135-142.
- Sumbodo, A. 2009. Pengaruh pemberian kejutan panas terhadap keberhasilan triploidisasi ikan lele dumbo (*Clarias gariepenus*). Skripsi, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Tamam, B. 2011. Pengaruh kejutan panas terhadap tingkat penetasan dan kelulusan hidupan pada gynogenesis meiosis ikan mas (*Cyprinus carpio* L). *Embryo*, 8(1):60-64.
- Yusuf, D. H., Sugiharto, G. E. Wijayanti. 2014. Perkembangan post-larva ikan nilam (*Osteochilus hasselti* C.V) dengan pola pemberian pakan berbeda. *Scripta Biologica*, 1(3): 7-14.