

Aplikasi Kejutan Suhu Terhadap Pembentukan Ikan Patin (*Pangasius hypopthalmus*) Tetraploid

Application Temperature Shock to Form Tetraploid Catfish (*Pangasius hypopthalmus*)

Dwi Puji Hartono*, Pindo Witoko, Ninik Purbosari

Program Studi Budidaya Perikanan Politeknik Negeri Lampung,

Jl Soekarno Hatta no 10 Bandar Lampung, Indonesia

*e-mail : dwiph@polinela.ac.id

ABSTRACT

This research aims to produce super brood of catfish who has a chromosome structure 4N (tetraploid) which will be used as a basis to generate triploid catfish. The specific objective of research was to determine the proper method to produce tetraploid individual catfish, knowing the character of the growth of catfish tetraploid, and knowing the character of morphometric and meristik catfish tetraploid. The study was conducted in Fisheries Laboratory of Lampung State Polytechnic and planned to be carried through three stages: Formation of catfish tetraploid by applying the method of temperature shock, fish ploidy analysis of treatment outcome, and the tetraploid selection. Special Purpose study is to get the population of catfish that have to be tetraploid or 4N ploidy and produce brood catfish putatively tetraploid. Target outcomes study the third year that the main candidates tetraploid. The results of research conducted showed tetraploid individuals found in all treatments given temperature shock to the level of an individual percentage of catfish tetraploid between 5-30%. The determination of ploidy levels in catfish is done using a calculation of the number nucleolus. Individual catfish nucleolus tetraploid have maximum 5-6 pieces.

Keyword: catfish, tetraploid, engineered chromosome, genetics

Diterima: 30 Agustus 2016, disetujui: 05 September 2016

PENDAHULUAN

Upaya peningkatan produksi perikanan budidaya sebagai target utama pembangunan *subsector* perikanan dapat dicapai antara lain melalui perbaikan teknik budidaya dan penyediaan benih yang cukup dan berkualitas. Perbaikan teknik budidaya harus selalu diikuti oleh penyediaan benih yang berkualitas. Penyediaan benih berkualitas pada ikan patin dapat dilakukan dengan melalui penyediaan benih yang bersifat steril atau triploid. Thorgaard (1983) menjelaskan, bahwa ikan triploid bersifat steril dan berpotensi dalam mengontrol overpopulasi, meningkatkan laju pertumbuhan juvenil, mempertahankan sintasan, dan pertumbuhan pada ikan dewasa. Menurut Zohar (1989) dan Chao, *dkk.*, (1993) bahwa gonad ikan triploid tidak berkembang sehingga dapat mengatasi persoalan terlalu cepatnya kematangan kelamin dan pertumbuhan tubuh serta kualitas daging ikan menjadi meningkat. Beaumont, (1994) menambahkan, bahwa sterilitas dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan produksi karena energi metabolisme yang biasanya digunakan untuk perkembangan gonad dimanfaatkan untuk pertumbuhan. Hartono *dkk* (2009) menyatakan bahwa tingkat pertumbuhan ikan patin triploid dapat mencapai 11,13% atau rata-rata meningkat sebesar

3,00% dari tingkat pertumbuhan ikan patin diploid normal. Pembentukan individu triploid dapat dilakukan dengan cara menahan terlepasnya polar body II (Thogaard dan Gall, 1979), atau dengan cara mengawinkan ikan tetraploid dengan ikan diploid normal (Ihhsen *et al.*, 1990). Hartono *dkk* (2008) menyatakan bahwa pembentukan populasi ikan patin triploid melalui kejutan suhu dapat menghasilkan individu triploid hingga 78,33%. Namun lebih lanjut dikatakan keberhasilan dalam membentuk individu triploid tidak diikuti oleh keberhasilan jumlah produksi benih karena tingkat *hatching rate* dan *survival rate* yang rendah yang rendah akibat perlakuan kejutan yang diberikan. Pembentukan individu triploid sulit dikembangkan pada masyarakat umum, karena membutuhkan tingkat ketelitian yang tinggi serta sulit dikembangkan secara massal. Pengembangan individu triploid mempunyai tingkat kesulitan yang cukup tinggi jika dilakukan secara langsung. Tingkat keberhasilan produksi benih ikan patin triploid melalui perlakuan kejutan suhu berkisar 20--30% dari pengembangan ikan patin secara normal. Hal ini disebabkan selain membutuhkan ketelitian yang tinggi juga disebabkan karena proses tidak bisa dilakukan secara massal sehingga populasi yang dihasilkan terbatas. Kondisi ini menyebabkan pengembangan ikan triploid secara langsung masih sulit dilakukan. Salah satu alternatif pengembangan ikan patin triploid adalah melalui metode kedua yaitu melalui persilangan ikan tetraploid dengan ikan diploid normal.

Pembentukan individu tetraploid merupakan proses antara dalam menghasilkan benih ikan triploid. Tetraploidisasi merupakan metode rekayasa kromosom dalam rangka pembentukan individu yang mempunyai set kromosom $4n$ dan dilakukan dengan pemberian perlakuan fisik atau kimia melalui pencegahan peloncatan pembelahan sel pertama (Carman *et al.* 1992). Thorgaard (1983) menjelaskan, pendekatan praktis untuk induksi tetraploidi melalui kejutan suhu merupakan perlakuan aplikatif sesaat setelah pembelahan pertama pada suhu *lethal*. Kejutan suhu selain murah dan mudah, juga efisien dapat dilakukan dalam jumlah banyak (Rustidja, 1991). Bidwell *et al.* (1985) melaporkan, pembuatan ikan tetraploid ditentukan oleh kondisi optimum, waktu fertilisasi akhir, suhu kejutan, dan lama kejutan. Tujuan khusus penelitian adalah mengetahui perlakuan suhu optimal, waktu pemberian kejutan dan lama waktu kejutan dalam menghasilkan populasi ikan patin tetraploid.

METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari--Juni 2016 di Laboratorium Perikanan Politeknik Negeri Lampung, Propinsi Lampung, Indonesia. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode kejutan suhu menggunakan initial time atau umur zigot 40 menit, pada suhu 40°C dan lama waktu kejutan 150 detik. Setelah dilakukan kejutan suhu dari setiap perlakuan, telur dimasukkan ke dalam akuarium penetasan untuk proses inkubasi. Proses inkubasi telur dilakukan di dalam akuarium yang telah diberi air setinggi 20 cm hingga terjadi penetasan telur. Telur yang telah ditebar pada media penetasan dibiarkan dan diamati perkembangannya untuk menentukan derajat pembuahan. Pengamatan derajat pembuahan dilakukan dengan mengamati perkembangan telur yang dibuahi dan yang tidak dibuahi. Telur ikan patin akan menetas setelah 20-26 jam dari proses pembuahan. Penyiponan dilakukan pada media penetasan untuk membuang telur yang tidak menetas.

Proses pemijahan dilakukan dengan menggunakan metode kawin suntik (*induce breeding*) dengan bantuan rangsangan hormon ovaprim. Dosis yang digunakan dalam penyuntikan adalah 0,9 ml/kg. Penyuntikan hanya dilakukan pada induk betina dan dilakukan sebanyak 2 kali dengan perbandingan 1/3 dosis digunakan untuk penyuntikan pertama dan 2/3 dosis digunakan untuk penyuntikan kedua. Jarak antar penyuntikan adalah 10 jam. Ovulasi telur dilakukan setelah 6-8 jam dari penyuntikan kedua dengan cara distriping. Telur hasil striping selanjutnya dibuahi dengan sperma dari induk jantan dan diberi larutan NaCl 0,9 % untuk membantu proses pembuahan telur.

Telur yang telah dibuahi sperma ditebar pada akuarium yang telah diberi lempengan kaca sebagai tempat menempel telur ikan patin. Kejutan suhu menggunakan initial time atau umur zigot 40 menit, pada suhu 40 °C dan lama waktu kejutan 150 detik. Setelah dilakukan kejutan suhu dari setiap perlakuan, telur dimasukkan ke dalam akuarium penetasan untuk proses inkubasi. Proses inkubasi telur dilakukan di dalam akuarium yang telah diberi air setinggi 20 cm hingga terjadi penetasan telur.

Telur yang telah ditebar pada media penetasan dibiarkan dan diamati perkembangannya untuk menentukan derajat pembuahan. Pengamatan derajat pembuahan dilakukan dengan mengamati perkembangan telur yang dibuahi dan yang tidak dibuahi. Telur ikan patin akan menetas setelah 20-26 jam dari proses pembuahan. Penyiponan dilakukan pada media penetasan untuk membuang telur yang tidak menetas.

Larva ikan patin hasil penetasan dipelihara pada akuarium. Pemberian pakan dilakukan setelah larva berumur 3 hari. Pakan yang diberikan adalah artemia dengan frekuensi pemberian sebanyak 6 kali yaitu pada pukul 07.00, 11.00, 15.00, 19.00, 22.00, dan 02.00 WIB. Pemberian artemia dilakukan hingga larva berumur 10 hari dan dilanjutkan dengan cacing sutera hingga berumur 21 hari. Pada media pemeliharaan larva dilakukan penyiponan dan pergantian air setiap 2 hari sekali untuk menjaga kondisi media tetap bersih. Pemeliharaan benih dilakukan selama 30 hari.

Penentuan keberhasilan kejutan suhu yang dilakukan dilihat melalui pengamatan jumlah nukleoli. Pengamatan jumlah nukleoli setiap individu dari masing-masing perlakuan diambil sampel sebanyak 50 ekor ikan uji. Dari masing-masing ikan uji dilakukan pengambilan organ jaringan sirip. Organ sirip dicincang dalam larutan KCL 0,75 M dan dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya larutan KCL diganti dengan larutan Carnoy (campuran asam asetat dengan etanol absolut dengan perbandingan 3:1) dan dibiarkan terendam selama 60 menit. Setelah perendaman dilakukan pembuatan preparat dengan mengambil organ dan ditetesi dengan asetat 50% di atas gelas objek dan dilanjutkan dengan pewarnaan dengan perak nitrat. Lalu preparat tersebut dimasukan ke dalam *box staining* selama 20 menit pada suhu 45 °C. Setelah itu preparat dibilas dengan air dan dibiarkan kering hingga dapat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 atau 1000 kali. Individu ikan patin tetraploid dicirikan berdasarkan jumlah nukleolus dalam satu sel yaitu maksimal sebanyak 6 buah.

Pengamatan ikan uji hasil kejutan suhu dilakukan terhadap persentase individu tetraploid (4n). Keberhasilan tetraploidisasi merupakan persentase jumlah ikan uji yang tetraploid (set kromosom 4n) dari jumlah total ikan uji yang diamati untuk tiap perlakuan. Keberhasilan tetraploidisasi ini didasarkan pada hasil pengujian yang dilakukan dengan metode pengitungan jumlah nucleolus dan jumlah kromosom.

$$Kt (\% \text{ ind tetraploid}) = (\text{ ind tetraploid} / \text{ ikan uji}) \times 100\%$$

Pengamatan derajat pembuahan dilakukan 8-10 jam setelah perlakuan kejutan dilakukan. Pengamatan dilakukan pada media sampel yang digunakan dengan menghitung jumlah telur yang dibuahi dari total telur sampel masing-masing perlakuan. Warna telur yang terbuahi berwarna bening sedangkan yang tidak terbuahi berwarna putih susu. Nilai derajat pembuahannya (%FR) dihitung dengan rumus (Effendi, 1979):

$$FR = (\text{Jumlah telur terbuahi} / \text{Jumlah telur total}) \times 100\%$$

Pengamatan derajat penetasan dilakukan setelah telur menetas atau 30 jam pasca pembuahan. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang menetas pada tiap-tiap sampel perlakuan. Nilai derajat penetasan (% HR) dihitung dengan rumus (Effendi, 1979):

$$HR = (\text{Jumlah larva menetas} / \text{Jumlah telur terbuahi}) \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Derajat pemuahan, derajat penetasan telur, dan Kelangsungan hidup larva

Penelitian yang dilakukan terhadap embrio ikan patin dengan memberikan kejutan suhu pada suhu 40 °C, selama 150 detik pada umur zigot 40 menit dilakukan pada 10 media dan satu kontrol.

Hasil pengamatan derajat pemuahan kegiatan pemijahan ikan patin yang telah dilakukan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat derajat pemuahan telur ikan patin

Uraian	Treatment										Kontrol
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	
Jumlah Telur	2400	2350	2474	1598	1682	1747	2515	2750	2472	2242	3190
Jumlah dibuahi	1915	1922	1852	1285	1326	1442	1645	2259	1829	1877	2720
% FR	79,8%	81,8%	74,9%	80,4%	78,8%	82,5%	65,4%	82,1%	74,0%	83,7%	85,3%

Keterangan : A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10 : media pemeliharaan larva ikan patin hasil kejutan suhu

Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa tingkat derajat pemuahan telur antara media kontrol dengan media perlakuan relatif sama dengan tingkat derajat pemuahan telur berkisar antara 65,4 % – 85,3%. Hal ini disebabkan karena pada proses pemuahan telur dilakukan sebelum proses pemberian kejutan suhu sehingga tidak memberikan dampak yang besar terhadap pemuahan telur ikan patin. Tingkat rata-rata derajat pemuahan telur yang lebih rendah dapat disebabkan karena kejutan setelah 40 menit dari proses pemuahan memberikan dampak pada kerusakan lapisan chorion pada telur. Namun belum memberikan pengaruh pada penetasan telur. Tingkat derajat penetasan telur ikan patin hasil pemberian kejutan suhu pada embrio disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Tingkat derajat penetasan telur ikan patin hasil perlakuan kejutan suhu

Kegiatan	Treatment										Kontrol
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	
Jumlah Telur dibuahi	1915	1922	1852	1285	1326	1442	1645	2259	1829	1877	2720
Jumlah menetas	875	932	942	624	648	562	721	872	879	672	1892
%HR	45,7%	48,5%	50,9%	48,6%	48,9%	39,0%	43,8%	38,6%	48,1%	35,8%	69,6%

Berdasarkan Tabel 2, menunjukkan bahwa embrio yang diberi kejutan suhu pada suhu 40 °C, selama 150 detik pada umur zigot 40 menit didapatkan derajat penetasan yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Media yang diberi kejutan suhu menghasilkan derajat penetasan berkisar 38,6%--50,9% jauh dibawah media kontrol yang memberikan derajat penetasan telur sebesar 69,6%. Rendahnya derajat penetasan telur akibat pemberian kejutan suhu pada embrio ini disebabkan karena kejutan suhu dapat merusak lapisan chorion pada embrio sehingga dapat menghambat perkembangan embrio bahkan menyebabkan kematian pada embrio sebelum menetas. Selain itu rendahnya derajat penetasan ini disebabkan adanya perbedaan kelangsungan hidup embrio ikan patin yang disebabkan karena goncangan yang terjadi pada saat tetraploidisasi. Halini didukung oleh pernyataan Lagler *et al.*(1977) yaitu goncangan, kejutan dan perubahan temperatur yang cepat sangat berbahaya pada periode sensitif awal, bahkan dapat berakibat kematian embrio. Hal inilah yang mempengaruhi rendahnya derajat penetasan telur pada media yang diberi perlakuan kejutan suhu. 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. Sedangkan Pandian & Varadaraj (1990) menyatakan beberapa telur yang diberi kejutan panas mati sebelum atau sesaat setelah menetas. I. Lebeda dan M. Flaishans (2015) melaporkan kejutan suhu menyebabkan tingkat penetasan penurunan telur ikan sturgeon Siberia (*Acipenser baerii*). Mirip dengan hasil penelitian ini, dilaporkan bahwa peningkatan intensitas tekanan atau durasi akan menurunkan tingkat penetasan (Juni *et al.* 2007).

Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan dalam kelangsungan hidup embrio karena goyang yang terjadi selama tetraploidization. Ini adalah selaras dengan pernyataan Lagler *et al.* (1977) yang mengguncang, shock, dan perubahan yang cepat dari suhu yang sangat berbahaya selama periode sensitif awal dan bahkan mengakibatkan kematian embrio. Itu kondisi ini yang mempengaruhi penetasan rendah setiap perlakuan *shock* suhu. Tave (1993) menunjukkan bahwa angka kematian kemungkinan disebabkan oleh sejumlah efek merugikan dari terapi kejut pada sitoplasma telur. Suhu terapi kejut dapat menyebabkan kerusakan pada benang spindle yang terbentuk selama proses fisi sel dalam telur (Gill *et al.*, 2016).

Tabel 3. Tingkat kelangsungan hidup larva ikan patin hasil perlakuan kejutan suhu

Kelang sungan Hidup	Treatment										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Kontrol
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
SR H5	77,7	65,7	58,4	78,8	75,9	73,8	64,9	70,2	60,3	61,9	85,6
SR H10	67,7	63,1	53,5	64,4	67,1	67,6	54,1	66,5	55,7	58,0	81,4
SR H15	58,5	57,3	49,0	61,2	63,6	55,0	50,2	62,2	50,5	49,7	78,8
SR H20	52,9	54,3	44,8	56,7	56,2	51,2	43,0	58,5	46,9	44,9	70,3
SR H25	45,9	52,6	42,5	55,9	46,5	36,3	38,8	56,2	44,8	39,9	66,2
SR H30	42,4	49,8	40,6	51,6	40,0	30,1	37,0	54,1	42,2	33,9	64,7

Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup ikan hasil pemberian kejutan suhu pada fase embrio berkisar 30,1--54,1 % dan berada dibawah kontrol dengan tingkat kelangsungan hidup larva ikan patin sebesar 64,7 %. Rendahnya tingkat kelangsungan hidup larva ini diduga disebabkan oleh abnormalitas perkembangan organ pada fase organogenesis sebagai dampak dari kejutan suhu yang diberikan. Hal ini didukung bahwa tingkat kematian tertinggi diperoleh pada minggu pertama setelah menetas atau pada masa perkembangan organ.

Tingkat Ploidi ikan

Pengamatan ploidi ikan dilakukan pada saat ikan berumur 20 hari. Hasil pengamatan tingkat ploidi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil identifikasi ploidi ikan patin hasil pemberian kejutan suhu

Tingkat Ploidi	Persentase ploidi ikan patin (%)										
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Kontrol
2n	65	60	60	35	35	25	45	60	65	35	100
3n	15	20	5	40	40	45	45	35	15	35	0
4n	20	20	35	25	25	30	10	5	20	30	0

Berdasarkan Tabel 4, menunjukkan bahwa pemberian kejutan suhu dapat menghasilkan benih ikan patin tetraploid berkisar 5- 30%. Hal ini terlihat dari hasil pengamatan nukleolus yang menunjukkan jumlah ploidi lebih dari 4 bersifat tetraploid. Perlakuan kejutan suhu telah menghasilkan dihasilkan individu tetraploid meskipun dengan berbagai persentase. Hal ini menunjukkan bahwa kejutan suhu pada embrio

mampu mencegah terjadinya pembelahan sel pada tahap mitosis menghasilkan pembentukan individu tetraploid dan tidak mengakibatkan kematian total zigot. Kejutan suhu pada 40 °C dan durasi 150 detik menghasilkan persentase tertinggi individu tetraploid. Menurut Corely-Smith *et al* (1996), suhu shock selama dua menit adalah waktu yang efektif untuk menghambat pembelahan mitosis pertama dalam produksi androgen dan gynogens di *Danio rerio*.

Studi ini menunjukkan bahwa ikan patin tetraploid dapat dilakukan dengan kejutan panas pada embrio. Ikan patin tetraploid dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghasilkan ikan patin triploid dengan mengawini individu diploid. Ketersediaan tetraploids untuk produksi triploid akan meningkatkan ketersediaan dan mengurangi biaya triploid pada ikan (Weber, G.M. *et al.*, 2015). Diperoleh keturunan tetraploid dapat digunakan untuk produksi diploid, yang dapat digunakan untuk menghindari konsekuensi negatif dari pengobatan restorasi ploidi dalam produksi triploid (Lebeda *et al.*, 2015). Hal ini dapat meningkatkan kualitas patin yang dapat meningkatkan produktivitas budidaya ikan patin. Hartono *et al* (2009) menunjukkan bahwa tingkat pertumbuhan ikan patin triploid dapat mencapai 11,13% atau meningkat rata-rata 3,00% dari laju pertumbuhan patin diploid normal.

KESIMPULAN

Individu tetraploid ditemukan pada semua perlakuan kejutan suhu yang diberikan dengan tingkat persentase individu ikan patin tetraploid berkisar antara 5--30%. Penentuan tingkat ploidi pada ikan patin dilakukan menggunakan perhitungan jumlah nucleolus. Individu ikan patin tetraploid mempunyai nucleolus maksimal 5-6 buah.

DAFTAR PUSTAKA

- Beaumont A. R., 1994 Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman & Hall, London, pp. 467-485.
- Bidwell C. A., Chrisman C. L., Libey G. S., 1985 Polyploidy induced by heat shock in channel catfish. *Aquaculture* 51:25-32.
- Carman O., 1992 Chromosome set manipulation in some warm-water fish. PhD Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 131 pp.
- Chao N. H., Hsu H. W., Hsu H. Y., Liang W. H., Liao I. C., 1993 Studies on methods of triploidy percentage analysis. *TML Conference Proceedings* 3:203-210.
- Chourrout D, Chevassus B, Krieg F, Happe A, Burger G, Renard P., 1986 Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females — potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.* 72: 193-206.
- Chourrout D. 1984 Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture* 36: 111-126.
- Corely-Smith G. E., Lim C. J., Brandhorst B. P., 1996 Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* 142:1265-1276.
- Effendi M. I., 1979. Fisheries biological method. Dewi Sri Foundation, Bogor, 112 pp.

Hartono, dkk : Aplikasi kejutan suhu terhadap pembentukan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) tetraploid.

- El Gamal A-RA, Davis KB, Jenkins JA, Torrains LE., 1999 Induction of triploidy and tetraploidy in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). J. World Aquacult. Soc. 30: 269-275.
- Gil, Hyun Woo; Kong, Hee Jeong; An, Cheul Min; Kim, Bong-seok; Lim, Sang-gu., 2016 Cytogenetic study of diploid and induced tetraploid in Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii*. SpringerPlus 5.1 (Feb 2016): 1-10.
- Goudie CA, Simco BA, Davis KB, Liu Q., 1995 Production of gynogenetic and polyploid catfish by pressure-induced chromosome set manipulation. Aquaculture 133: 185-198.
- Hartono D. P., Febriani D., Marlina E., 2009 The temperature influence on the formation of individual cold shock triploid catfish (*Pangasius* sp). Proceedings of the National Seminar on Appropriate Technology Agroindustri, Lampung State Polytechnic, Lampung, 55 p.
- Hartono, D.P., P. Witoko., N. Pubosari., 2016. The effect of heat shock on the tetraploidy of catfish, *Pangasius hypophthalmus*. AACL Bioflux, 2016, Volume 9, Issue 3.
- Ihssen P. E., McKay L. R., McMillan I., Phillips R. B., 1990 Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. Transaction of the American Fisheries Society 119:698-717.
- Jun D, Chang Y, Wang Z, Song J., 2007 Polyploidy induction by hydrostatic pressure shock and embryo development of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Chin J Oceanol Limnol 25:184-190.
- Lagler K. F., Bardach J. E., Miller R. R., Passino D. R. M., 1977 Ichthyology. John Willey and Sons Inc, New York-London, 506 pp.
- Lebeda, I and M. Flaishans., 2015 Technical note: Production of tetraploid sturgeons. American Society of Animal Science 93:3759-3764.
- Luo K, Xiao J, Liu S, Wang J, He W, Hu J, Qin Q, Zhang C, Tao M, Liu Y., 2011 Massive production of all-female diploids and triploids in the crucian carp. Int. J. Biol. Sci. 7: 487-495.
- Malison JA, Kayes TB, Held JA, Barry TP, Amundson CH., 1993 Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation. Aquaculture 110: 229-242.
- Malison JA, Garcia-Abiado MAR., 1996 Sex control and ploidy manipulations in yellow perch (*Perca flavescens*) and walleye (*Stizostedion vitreum*) J. Appl. Ichthyol. 12: 189-194.
- Myers JM. 1986 Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. Aquaculture 57: 281-287.
- Myers JM, Hershberger WK., 1991 Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Aquaculture 96: 97-107.

Hartono, dkk : Aplikasi kejutan suhu terhadap pembentukan ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) tetraploid.

Rustidja S., 1989 Artificial induced breeding and triploidy in the Asian catfish (*Clarias batrachus* Linn.). PhD thesis, Faculty of Graduate Studies, Bogor Agricultural Institute, Bogor, 80 pp.

Sakao S, Fujimoto T, Kimura S, Yamaha E, Arai K., 2006 Drastic mortality in tetraploid induction results from the elevation of ploidy in masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture* 252: 147-160.

Tave D., 1993 Genetics for fish hatchery managers. Second edition, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 267-304.

Thorgaard G. H., 1983 Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Fish physiology. Hoar W. S., Randall D. J., Donaldson M. (eds), Volume IX B, Academic Press, Inc. London, pp. 405-434.

Thorgaard G. H., Gall G. A. E., 1979 Adult triploid in rainbow trout family genetics. *Genetics* 93:961-973.

Weber GM, Wiens GD, Welch TJ, Hostuttler MA, Leeds TD., 2013 Comparison of disease resistance between diploid, induced-triploid, and intercross-triploid rainbow trout including trout selected for resistance to *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* 410–411: 66-71.

Weber GM, Hostuttler MA, Cleveland BM, Leeds TD., 2014 Growth performance comparison of intercross-triploid, induced triploid, and diploid rainbow trout. *Aquaculture* 433: 85-93.

Weber GM, Hostuttler MA, Semmens KJ, Beers BA., 2015 Induction and viability of tetraploids in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 72(10): 1443-1449.

Zhang X, Asami T, Onozato H., 2007 Polypolar spindle formation during first cell cycle in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* embryos after heat-shock treatment. *Fish. Sci.* 73: 1325-1331.

Zhang Z, Chen J, Li L, Tao M, Zhang C, Qin Q, Xiao J, Liu Y, Liu S. 2014 Research advances in animal distant hybridization. *Sci. China Life Sci.* 57: 889-902

Zohar Y., 1989 Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation Creating Bibliography. In: Fish culture in warm water systems: problems and trends. Shilo M., Sarig S. (eds), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 65-120.