



Studi Pendahuluan: Pengaruh Krioprotektan yang Berbeda terhadap Persentase Kerusakan dan Penetasan Embrio Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*)

Preliminary Study: The Effects of Different Cryoprotectants on Damage and Hatching Rates of African Catfish (*Clarias gariepinus*)

Akhmad Taufiq Mukti^{1*}, Septuresty Hartri Eka², Woro Hastuti Satyantini¹ dan Ahmad Shofy Mubarak³

¹Departemen Manajemen Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jl. Dr. Ir. H. Soekarno, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

²Program Studi Bioteknologi Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jl. Dr. Ir. H. Soekarno, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

³Departemen Kelautan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jl. Dr. Ir. H. Soekarno, Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

*Correspondence :
akhmad-t-m@fpk.unair.ac.id

Received : 2019-12-09
Accepted : 2020-06-01

Kata Kunci :
Krioprotektan, Kriopreservasi embrio, Embrio fase gastrula, Kerusakan dan penetasan embrio, Ikan Lele

Keywords :
Cryoprotectant, Embryo cryopreservation, Gastrula-staged embryo, Damage and hatching, African Catfish

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh krioprotektan yang berbeda dalam kriopreservasi embrio terhadap persentase kerusakan dan penetasan embrio ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Embrio ikan lele pada fase gastrula diberi perlakuan larutan dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), madu, dan kombinasinya dengan konsentrasi 5% untuk masing-masing perlakuan. Embrio disimpan pada suhu 4 dan 0°C, masing-masing selama 30 menit, 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 jam. Thawing embrio dilakukan pada suhu 28°C. Selanjutnya, embrio diinkubasi dalam akuarium pada suhu 28°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan krioprotektan dalam kriopreservasi embrio fase gastrula memberikan perbedaan kerusakan dan penetasan embrio ikan lele pada lama waktu penyimpanan yang berbeda. Persentase kerusakan embrio meningkat seiring dengan lama waktu penyimpanan dan suhu penyimpanan yang berbeda. Kombinasi larutan krioprotektan DMSO dan madu serta PG dan madu menunjukkan persentase kerusakan embrio yang lebih rendah dan persentase penetasan embrio yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan krioprotektan lainnya ($p < 0,05$).

Abstract

This study was aimed to observe the effects of different cryoprotectants in embryo cryopreservation on damage and hatching rates of African catfish (*Clarias gariepinus*) embryo. The gastrula-staged embryos were treated 5% (v/v) solutions concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol (PG), honey, and combined cryoprotectants, respectively and preserved at temperatures of 4 and 0°C for 30 min, 1 h, 2 h, 3

h, 4 h, 5 h, and 6 h, respectively. Thawing of embryos was conducted in freshwater at a temperature of 28°C. Then, the embryos were incubated in the aquaria at 28°C temperature. The result showed that the different cryoprotectants in gastrula-staged embryo cryopreservation affect damage and hatching rates of African catfish embryos at different length of preservation. The percentage of catfish embryo damage increases with different length of preservation and the storage temperature. A combination of DMSO-honey and PG-honey has the lowest damage percentage and the highest hatching rate of catfish embryo compared to other treatments ($p < 0.05$).

PENDAHULUAN

Teknis kriopreservasi pada embrio ikan telah dimulai beberapa dekade yang lalu (Chao dan Liao, 2001; Beirao *et al.*, 2006; Lahnsteiner, 2009; Fornari *et al.*, 2011, 2012). Pengembangan protokol kriopreservasi untuk embrio ikan sangat penting dalam upaya manajemen stok perikanan, pembuatan bank gen (*gene bank*) spesies ikan, konservasi populasi ikan, dan studi pengujian ekotoksikologi (Zhang *et al.*, 2005).

Pengetahuan tentang krioprotektan dan toksisitasnya, konsentrasi dan kombinasi krioprotektan yang sesuai, dan metode pendinginan (*cooling*) sangat penting untuk menunjang keberhasilan kriopreservasi embrio (Zhang *et al.*, 2005). Selain itu, pengetahuan tentang sensitivitas embrio terhadap pendinginan sangat penting diketahui. Hal ini tergantung pada fase perkembangan embrio. Fase awal embrio dan pasca gastrulasi merupakan fase sangat sensitif dari fase perkembangan embrio dalam kriopreservasi (Ahammad *et al.*, 2002).

Krioprotektan permeabel yang umum digunakan dalam kriopreservasi antara lain *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dan *propylene glycol* (PG). DMSO adalah bahan yang efektif untuk melarutkan senyawa polar dan non polar, menghambat pertumbuhan bakteri dalam sampel akuatik, memiliki tingkat toksisitas yang rendah, dan memiliki kemampuan sangat baik untuk menembus membran biologis tanpa menyebabkan perubahan integritas struktural sel (Kais *et al.*, 2013), sedangkan PG adalah cairan fungsional

sebagai cairan anti beku (*antifreeze*), mencegah pembentukan es (*de-icing*), transfer panas (*heat transfer*), dan *unsaturated polyester resins* (Dasaria *et al.*, 2005). Madu sebagai salah satu krioprotektan non-permeabel memiliki kandungan fruktosa 38,4%, sukrosa 1,3%, dan glukosa 30,3% (Ball, 2007) dan memiliki peran penting sebagai antibakteri, sumber energi dan antioksidan (Sheshtawy *et al.*, 2016).

Beberapa studi tentang kriopreservasi embrio telah dilakukan pada beberapa spesies ikan (Ahammad *et al.*, 2002, 2003; Xiao *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009a; Lin *et al.*, 2009b; Shaluei *et al.*, 2013; Sharifuddin dan Azizah, 2014; Lopes *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2015) akan tetapi, belum menunjukkan hasil yang maksimal. Kriopreservasi embrio merupakan salah satu pendekatan dalam penyediaan stok larva atau benih ikan dengan kemudahan transportasi embrio melalui penyimpanan embrio dan material genetik spesies ikan untuk aplikasi di masa mendatang. Studi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh krioprotektan yang berbeda dalam kriopreservasi embrio terhadap persentase kerusakan dan penetasan embrio ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli - September 2019 di Laboratorium Basah Fakultas Perikanan

dan Kelautan dan *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga serta laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Materi Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, akuarium berukuran 1×0,5×0,5 m (volume 100 L), termostat, *cold box*, saringan, mangkok melamin, *refrigerator* (4 dan 0°C), dan mikroskop binokuler (Olympus CX41, Japan) beserta kamera.

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah induk ikan lele jantan dan betina, embrio ikan lele stadia gastrula, bulu ayam, ovaprim™ (Sundale, USA), NaCl fisiologis (0,9%), DMSO (Merck, Germany), PG (Merck, Germany), madu (Tawon Lawang Agro Tourism, Malang), dan es kering (*dry ice*).

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan faktor pertama adalah jenis dan kombinasi krioprotektan (DMSO, PG, dan madu) dan faktor kedua adalah suhu kriopreservasi (4 dan 0°C). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

Prosedur Kerja

Pemijahan Buatan dan Koleksi Telur dan Sperma Ikan

Pemijahan buatan induk ikan lele dilakukan melalui induksi hormonal (ovaprim™) 0,5 dan 0,3 ml/kg bobot tubuh induk ikan, masing-masing untuk betina dan jantan. Injeksi hormonal dilakukan secara *intramuscular* (Mukti *et al.*, 2019). Setelah sekitar 12 jam induksi hormonal, induk ikan lele betina *distripping* untuk koleksi telur dan diletakkan pada wadah mangkok melamin yang kering dan disimpan pada suhu ruang, sedangkan induk ikan lele jantan dibedah untuk mendapatkan sperma ikan. Sperma ikan ditampung dalam spuit dengan pengenceran menggunakan NaCl

fisiologis sebanyak 10 kali dan disimpan dalam *refrigerator* suhu 4°C.

Fertilisasi Buatan

Fertilisasi buatan dilakukan melalui pencampuran sekitar 40 ribu telur dengan 3 ml larutan sperma dan diaduk rata secara perlahan menggunakan bulu ayam selama lebih kurang 1 menit. Selanjutnya, air bersih dengan suhu 28°C ditambahkan sebanyak 1-2 ml pada campuran telur dan sperma untuk proses fertilisasi telur dan diaduk secara perlahan menggunakan bulu ayam yang berbeda selama lebih kurang 1 menit. Telur dicuci dengan air bersih sebanyak dua kali.

Inkubasi telur terfertilisasi dilakukan pada akuarium dengan suhu air inkubasi 28°C hingga perkembangan embrio mencapai stadia gastrula (sekitar 6,5 jam setelah fertilisasi). Kemudian, embrio ikan lele yang mencapai stadia gastrulasi dimasukkan ke dalam *cryotube* 2 ml, masing-masing sebanyak 50 embrio untuk tiap perlakuan dan tiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

Perlakuan Krioprotektan

Pada penelitian ini, perlakuan krioprotektan yang digunakan adalah larutan DMSO, PG, madu, serta kombinasi DMSO-madu dan kombinasi PG-madu. Konsentrasi krioprotektan yang digunakan adalah 5% dalam pelarut NaCl fisiologis. Masing-masing perlakuan larutan krioprotektan dimasukkan dalam *cryotube* 2 ml. Kemudian, 50 embrio ikan lele fase gastrula yang baik dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis pada suhu 28°C selama 5 menit. Masing-masing embrio dalam *cryotube* sesuai perlakuan ditambahkan larutan krioprotektan menggunakan metode *ekuilibrium* modifikasi dari protokol Tian *et al.* (2015) dan Shaluei *et al.* (2013) pada suhu 28°C selama 30 menit.

Selanjutnya, embrio dalam *cryotube* disimpan pada suhu 4 dan 0°C menggunakan metode pendinginan cepat atau vitrifikasi. Masing-masing perlakuan disimpan selama 30 menit dan 1-6 jam.

Thawing

Setelah masa penyimpanan, *cryotubes* yang berisi embrio diambil secara cepat dari suhu penyimpanan dan dihangatkan (*thawing*) pada suhu air 28°C selama 30 menit. Setelah *thawing*, embrio diinkubasi pada akuarium suhu 28°C hingga menetas. Selama inkubasi, embrio diamati perkembangan dan kerusakannya hingga embrio menetas. Pengamatan embrio dilakukan di bawah mikroskop cahaya binokuler.

Analisis Data

Data dianalisis secara statistik menggunakan analisis varian (ANOVA).

Perbedaan perlakuan diuji menggunakan *Tukey's test*. Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS 20 software dengan tingkat kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan krioprotektan yang berbeda dalam suhu penyimpanan (preservasi) yang berbeda pada kriopreservasi embrio ikan lele stadia gastrula mempengaruhi persentase kerusakan (Tabel 1) dan penetasan embrio (Tabel 2) ikan lele.

Tabel 1. Persentase kerusakan embrio ikan lele pada perlakuan krioprotektan dan suhu preservasi yang berbeda.

Perlakuan	Suhu (°C)	Lama penyimpanan (jam)						
		0,5	1	2	3	4	5	6
Madu	4	48,7±1,2 ^c	48,7±1,2 ^d	52,0±0,0 ^d	53,3±1,2 ^d	56,0±0,0 ^c	62,7±1,2 ^d	70,0±0,0 ^b
	0	61,3±1,2 ^f	62,7±1,2 ^f	83,3±1,2 ^f	100,0±0,0 ^h	100,0±0,0 ^e	100,0±0,0 ^g	100,0±0,0 ^c
DMSO	4	41,3±1,2 ^b	39,3±1,2 ^c	48,0±0,0 ^c	50,0±0,0 ^c	51,3±1,2 ^b	65,3±1,2 ^e	69,3±1,2 ^b
	0	58,7±1,2 ^e	61,3±1,2 ^f	89,3±1,2 ^g	96,7±1,2 ^g	100,0±0,0 ^e	100,0±0,0 ^g	100,0±0,0 ^c
PG	4	40,7±1,2 ^b	38,7±1,2 ^{bc}	42,0±0,0 ^b	46,0±0,0 ^b	49,3±1,2 ^b	60,7±1,2 ^c	69,3±1,2 ^b
	0	58,7±1,2 ^e	59,3±1,2 ^{ef}	83,3±1,2 ^f	88,7±1,2 ^f	100,0±0,0 ^e	100,0±0,0 ^g	100,0±0,0 ^c
DMSO-Madu	4	39,3±1,2 ^b	36,7±1,2 ^{ab}	36,7±1,2 ^a	38,0±0,0 ^a	40,0±0,0 ^a	44,0±0,0 ^b	63,3±1,2 ^a
	0	56,7±1,2 ^{de}	59,3±1,2 ^{ef}	80,7±1,2 ^{ef}	88,0±0,0 ^f	90,7±1,2 ^d	100,0±0,0 ^g	100,0±0,0 ^c
PG-Madu	4	38,0±0,0 ^a	34,7±1,2 ^a	36,0±0,0 ^a	38,7±1,2 ^a	40,7±1,2 ^a	42,7±1,2 ^a	64,0±0,0 ^a
	0	55,3±1,2 ^d	58,0±2,0 ^e	79,3±1,2 ^e	86,0±0,0 ^e	88,7±1,2 ^d	96,7±1,2 ^f	100,0±0,0 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0.05$).

Pada Tabel 1 terlihat bahwa persentase kerusakan embrio tidak berbeda nyata antara perlakuan kombinasi DMSO-madu dan kombinasi PG-madu dan menunjukkan persentase terendah dibandingkan dengan perlakuan krioprotektan yang lain ($p < 0,05$), sedangkan suhu preservasi 0°C menghasilkan persentase kerusakan embrio yang lebih besar daripada suhu preservasi 4°C ($p < 0,05$). Pada perlakuan larutan madu, kerusakan embrio ikan lele total (100%) terjadi sejak lama penyimpanan 3 jam pada suhu 0°C, sedangkan pada perlakuan krioprotektan DMSO dan PG, masing-masing terjadi pada lama penyimpanan 4 jam.

Tabel 2 memperlihatkan bahwa persentase penetasan embrio juga tidak berbeda nyata antara perlakuan kombinasi DMSO-madu dan kombinasi PG-madu dan menunjukkan persentase tertinggi dibandingkan dengan perlakuan krioprotektan yang lain ($p < 0,05$). Sebagaimana persentase kerusakan embrio ikan lele, perlakuan madu pada suhu preservasi 0°C selama 3 jam sudah tidak menghasilkan penetasan embrio ikan lele (0%). Berdasarkan data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa persentase penetasan embrio pada suhu preservasi 4°C lebih besar daripada suhu preservasi 0°C ($p < 0,05$).

Tabel 2. Persentase penetasan embrio ikan lele pada perlakuan krioprotektan dan suhu preservasi yang berbeda.

Perlakuan	Suhu (°C)	Lama penyimpanan (jam)						
		0,5	1	2	3	4	5	6
Madu	4	51,3±1,2 ^{bc}	51,3±1,2 ^{ab}	48,0±0,0 ^b	46,7±1,2 ^d	44,0±0,0 ^c	37,3±1,2 ^c	30,0±0,0 ^b
	0	38,7±1,2 ^d	37,3±1,2 ^c	16,7±1,2 ^b	0,0±0,0 ^h	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^c
DMSO	4	58,7±1,2 ^b	60,7±1,2 ^{ab}	52,0±0,0 ^b	50,0±0,0 ^c	48,7±1,2 ^b	34,7±1,2 ^d	30,7±1,2 ^b
	0	41,3±1,2 ^d	38,7±1,2 ^c	10,7±1,2 ^b	3,3±1,2 ^g	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^c
PG	4	59,3±1,2 ^b	61,3±1,2 ^a	58,0±2,0 ^b	54,0±0,0 ^b	50,7±1,2 ^b	39,3±1,2 ^c	30,7±1,2 ^b
	0	41,3±1,2 ^d	40,7±1,2 ^c	16,7±1,2 ^b	11,3±1,2 ^f	6,0±0,0 ^e	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^c
DMSO-Madu	4	60,7±1,2 ^a	63,3±1,2 ^a	63,3±1,2 ^a	62,0±2,0 ^a	60,0±0,0 ^a	56,0±0,0 ^b	36,7±1,2 ^a
	0	43,3±1,2 ^d	40,7±1,2 ^c	19,3±1,2 ^b	12,0±0,0 ^f	9,3±1,2 ^d	0,0±0,0 ^f	0,0±0,0 ^c
PG-Madu	4	62,0±0,0 ^a	65,3±1,2 ^a	64,0±0,0 ^a	61,3±1,2 ^a	59,3±1,2 ^a	57,3±1,2 ^a	36,0±0,0 ^a
	0	44,7±1,2 ^d	42,0±2,0 ^c	20,7±1,2 ^b	14,0±0,0 ^e	11,3±1,2 ^d	3,3±1,2 ^e	0,0±0,0 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0.05$).

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa perbedaan krioprotektan dan suhu preservasi yang digunakan dalam kriopreservasi embrio ikan lele mengakibatkan kerusakan dan penetasan embrio ikan lele yang berbeda. Secara umum, kerusakan embrio lebih cepat terjadi pada suhu preservasi (penyimpanan) lebih rendah. Demikian pula pada penetasan embrio ikan lele, suhu preservasi yang lebih rendah (0°C) mengakibatkan rendahnya penetasan embrio ikan lele. Hal ini juga sebagaimana hasil yang diperoleh oleh Eka *et al.* (2020) bahwa suhu penyimpanan -196°C menghasilkan persentase kerusakan embrio total (100%) dan persentase penetasan terendah dibandingkan suhu preservasi -4°C.

Kerusakan embrio ikan akibat suhu preservasi kemungkinan dikarenakan perbedaan osmotik dan tingginya sensitivitas embrio ikan lele yang dikriopreservasi. Pendinginan secara cepat dapat menyebabkan kerusakan intraseluler sel secara serius, sehingga dapat menyebabkan kematian sel akibat penyusutan sel (Bhattacharya dan Prajapati, 2016). Penyusutan embrio berhubungan erat dengan permeabilitas membran sel dan sensitivitas pendinginan. Hagedorn *et al.* (1998) menyatakan bahwa pembatas permeabilitas pada embrio adalah *yolk synchronization layer* (YSL). Lapisan *syncytial* dari membran sel telur secara fisiologis akan mencegah

masuknya krioprotektan ke dalam sel dan pelepasan air dari dalam sel. Akan tetapi, pada kondisi tertentu, krioprotektan dapat masuk ke dalam lapisan *syncytial* dari sel telur dan mengeluarkan cairan dalam sel telur.

Kriopreservasi dengan metode vitrifikasi sebenarnya lebih efektif karena kerusakan sel dan jaringan sangat sedikit. Metode vitrifikasi dapat mengurangi air dari dalam sel dan digantikan oleh krioprotektan untuk mencegah terbentuknya *crystals ice* ketika pendinginan. Akan tetapi, beberapa faktor merupakan pembatas dalam keberhasilan kriopreservasi embrio, seperti ukuran sel yang besar, tipisnya korion, permeabilitas membran yang kurang, struktur yang kompleks dalam perkembangan embrio, dan kandungan *yolk* yang tinggi (Lin *et al.*, 2009b) serta embrio lebih sensitif terhadap krioprotektan (Tian *et al.*, 2015) bila dibandingkan dengan gamet.

Penggunaan larutan pengencer (NaCl fisiologis) krioprotektan memungkinkan sebagai salah satu faktor yang mempengaruhi kerusakan embrio ikan lele. Beberapa studi tentang penggunaan larutan pengencer atau ekstender dalam kriopreservasi juga telah dilakukan oleh beberapa peneliti lain sebelumnya, seperti Shaluei *et al.* (2013) pada embrio ikan mas koki (*Carassius auratus auratus*), Keivanloo *et al.* (2017) pada embrio ikan *Persian sturgeon* (*Acipenser persicus*), dan Tian *et al.* (2015)

pada embrio ikan kerapu (*Epinephelus septemfasciatus*).

KESIMPULAN

Jenis dan kombinasi krioprotektan dan suhu preservasi atau penyimpanan sangat berpengaruh terhadap kerusakan dan penetasan embrio ikan lele hasil kriopreservasi embrio pada stadia gastrula.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas sponsor pendanaan melalui Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) tahun 2019. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Rektor melalui Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi (LPI) Universitas Airlangga yang telah mendukung kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D. dan Jana, B.B., 2002. The hatching of common carp *Cyprinus carpio* L. embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology*, 44, pp. 114-121. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00012-3](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00012-3).
- Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D. dan Jana, B.B., 2003. Stage-dependent hatching responses of rohu *Labeo rohita* embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology*, 46, pp. 2-16. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00138-4](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00138-4).
- Ball, D.W., 2007. The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), pp. 43-46. <https://doi.org/10.1021/ed084p1643>.
- Beirao, J., Robles, V., Herraez, M.P., Sarasquete, C., Dinis, M.T. dan Cabrita, E., 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*, 261(3), pp.897-903. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.039>
- Bhattacharya, S. dan Prajapati, B.G., 2016. A Review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(3), pp. 154-159. <https://dx.doi.org/10.22377/ajp.v10i3.721>.
- Chao, N.H. dan Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197, pp. 161-189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-50913-0.50011-4>.
- Dasaria, M.A., Kiatsimkula, P.P., Sutterlin, W.R. dan Suppesa, G.J., 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis*, 281, pp. 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2004.11.033>.
- Eka, S.H., Mukti, A.T., Satyantini, W.H. dan Mubarak, A.S., 2020. Preliminary study: the effect of cryopreservation on the gastrula-staged embryo of African catfish (*Clarias gariepinus*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, (inpres). <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/441/1/012124>.
- Fornari, D.C., Ribeiro, R.P., Streit Jr., D.P., Godoy, L.C., Neves, P.R., Oliveira, D.D. dan Sirol, R.N., 2011. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. *Zygote*, 22, pp. 58-63. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000517>.
- Fornari, D.C., Ribeiro, R.P., Streit Jr., D.P., Vargas, L., Godoy, L.C., Oliveira, C.A.L., Digmayer, M., Galo, J.M. dan Neves, P.R., 2012. Increasing storage capability of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos by chilling: development of a useful methodology for hatcheries management. *CryoLetters*, 33, pp. 125-134. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22576116/>.

- Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Artemov, D. dan Pilatus, U., 1998. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biology of Reproduction*, 59, pp. 40-50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1240>.
- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C. dan Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Andio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology*, 33, pp. 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022>.
- Keivanloo, S., Mohammad, S. dan Hajibeglou, A., 2017. Effect of vitrification by propylene glycol-based solutions on the survival rate of the persian sturgeon *Acipenser persicus* embryos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, pp. 681-687. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_4_04.
- Lahnsteiner, F., 2009. Factors affecting storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, 72, pp. 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.003>.
- Lin, C., Spikings, S., Zhang, T. dan Rawson, D.M., 2009a. Effect of chilling and cryopreservation on expression of pax genes in zebrafish *Andio rerio* embryos and blastomeres. *Cryobiology*, 59, pp. 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.04.007>.
- Lin, C., Zhang, T. dan Rawson, D.M., 2009b. Cryopreservation of zebrafish *Andio rerio* blastomeres by controlled slow cooling. *Cryoletters*, 30(2), pp. 132-141. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19448862/>.
- Lopes, T.D.S., Sanches, E.A., Okawara, R.Y.O. dan Romagosa, E., 2015. Chilling of *Steindachneridion parahybae*, Siluriformes: pimelodidae embryos. *Theriogenology*, 84, pp. 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100046>.
- Mukti, A.T., Mubarak, A.S. dan Wahyurini, E.T., 2019. Aplikasi teknologi *induced spawning* untuk mempercepat pemijahan ikan lele pada mitra program kemitraan masyarakat. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 8(1), pp. 46-53. <http://dx.doi.org/10.20473/jafh.v8i1.12004>.
- Shaluei, F., Imanpoor, M.R., Shabani, A. dan Esfahani, N.M.H., 2013. Effect of different concentrations of permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish *Carassius auratus* embryos. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(3), pp. 185-188. [https://doi.org/10.1016/s2305-0500\(13\)60144-x](https://doi.org/10.1016/s2305-0500(13)60144-x).
- Sharifuddin, M.M. dan Azizah, M.N.S., 2014. Preliminary studies on cryopreservation of snakehead *Channa striata* embryos. *Cryobiology*, 69, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.001>.
- Sheshtawy, E.R.I., Badry, E.D.A., Sisy, E.G.A., Nattat, E.W.S. dan Almaty, A.M.A., 2016. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(4), pp. 331-334. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.apjr.2016.06.004>.
- Tian, Y., Jiang, J., Song, L., Chen, Z., Zhai, J., Liu, J., Wang, N. dan Chen, S., 2015. Effects of cryopreservation on the survival rate of the seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus* embryos. *Cryobiology*, 71, pp. 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.10.147>.
- Xiao, Z.Z., Zhang, L.L., Xu, X.Z., Liu, Q.H., Li, J., Ma, D.Y., Xu, S.H., Xue, Y.P. dan Xue, Q.Z., 2008. Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology*, 70, pp. 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.028>.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J. dan Chen, S.L., 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, 63, pp. 763-773. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.011>.