

## PROFIL SPERMATOZOA IKAN NILEM (*Osteochilus vittatus*) YANG DISIMPAN DALAM LARUTAN RINGER-GLISERIN

E Setiyono<sup>1\*</sup> dan P Raharjo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman,

Jalan dr. Soeparno 63 Grendeng, Purwokerto, Jawa Tengah 53122, Indoensia

<sup>2</sup>Laboratorium Biologi Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman,

\* E-mail : [eko.setiyono@unsoed.ac.id](mailto:eko.setiyono@unsoed.ac.id)

### Abstrak

Kelangsungan budidaya ikan sangat tergantung dengan penyediaan benih baik secara kuantitas maupun kualitas. Metode preservasi spermatozoa merupakan salah satu bioteknologi tepat guna yang dapat diterapkan untuk membantu penyediaan benih. Penelitian bertujuan untuk mengetahui profil spermatozoa ikan nilem sebelum dan sesudah penyimpanan dalam larutan ringer-gliserin. Materi yang digunakan adalah milt dan oosit ikan nilem. Penelitian ini dilakukan secara eksperimen pada tiga perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak dua belas kali. Perlakuan P0 menggunakan milt segar, perlakuan P1 dan P2 menggunakan milt yang disimpan secara preservasi pada suhu 4°C dalam larutan ringer-gliserin selama 3 hari dan 7 hari. Variabel yang diamati motilitas, fertilization rate (FR), daya tetes telur (HR). Variabel dianalisis menggunakan oneway anova dengan taraf signifikansi  $\alpha = 5\%$ . Hubungan antar variabel dilakukan uji korelasi dan pengaruhnya dengan uji regresi linear. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata motilitas spermatozoa P0, P1 dan P2 masing-masing sebelum dan setelah penyimpanan sebesar  $78,83 \pm 6,64\%$ ,  $65,5 \pm 4,42$  dan  $40,00 \pm 7,07\%$  dan antar perlakuan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Rata-rata FR spermatozoa sebelum dan sesudah penyimpanan berturut-turut adalah P0 =  $76,33 \pm 7,17\%$ , P1 =  $60,50 \pm 6,57$  dan  $22,60 \pm 5,23\%$  dan berbeda nyata antar perlakuan ( $P < 0,05$ ). Motilitas spermatozoa sebelum maupun setelah penyimpanan berkorelasi dan berpengaruh positif dengan HR ( $r = 94,50\%$ ;  $R^2 = 89,20\%$ ). Dapat disimpulkan bahwa spermatozoa yang disimpan secara preservasi pada suhu 4°C dalam larutan ringer-gliserin selama 3 hari masih memiliki kemampuan untuk memfertilisasi oosit segar dan mempertahankan jumlah telur yang menetas.

**Kata kunci:** Daya Fertilitas, Daya tetes, Ikan Nilem, Motilitas, Ringer-Gliserin)

### PENDAHULUAN

Ikan nilem (*Osteochilus vittatus*), adalah salah satu komoditas budidaya ikan air tawar yang terkonsentrasi di Pulau Jawa (Subagja *et al.*, 2006). Ikan nilem cukup dikenal dan disukai oleh masyarakat Banyumas dan sekitarnya. Ikan nilem memiliki beberapa potensi, diantaranya rasa daging yang enak, kenyal, gurih dan durinya tidak terlalu banyak jika dibandingkan dengan ikan tawes (Dewi dan Soeminto, 2005). Ikan ini dapat dinikmati mulai telur, ukuran larva (babyfish) dan ukuran konsumsi. Banyaknya potensi memberikan peluang untuk meningkatkan produksi ikan. Produksi ikan tidak terlepas dengan aktivitas pembenihan.

Penyediaan benih dalam jumlah yang besar dan berkualitas masih belum tercapai, hal ini dikarenakan ada beberapa kendala diantaranya adalah bidang reproduksi. Ikan nilem merupakan jenis ikan asynchronous, dimana kematangan telur tidak terjadi secara serempak melainkan bertahap. Sehingga besar kemungkinan terjadi ketika telur sudah matang, tidak tersedia sperma untuk membuahnya. Oleh karena itu diperlukan teknologi untuk menjaga ketersediaan sperma. Salah satu teknologi yang dapat digunakan yaitu pengawetan sperma ikan nilem dengan cara preservasi. Preservasi sperma dilakukan dengan cara mendinginkan spermatozoa dan menyimpannya pada temperatur refrigerator. Rendahnya temperatur menyebabkan struktur molekuler sel spermatozoa berada pada keadaan *fixed* dan tanpa gerakan sehingga mengurangi aktivitas metabolik sel tersebut (Stoss dan Donaldson, 1983; Suquet *et al.*, 2000).

Metode preservasi spermatozoa merupakan salah satu bioteknologi tepat guna yang dapat diterapkan untuk membantu penyediaan benih. Metode pengawetan spermatozoa sudah diterapkan

pada banyak ikan, diantaranya adalah ikan *mirror carp* (Ergun, 2004), ikan striped bass (*Morone saxatilis*) (He and Woods, 2003), ikan atlantic surgeon (*Acipenser sturio*) dan ikan piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Maria et al., 2006); ikan komet (Rahardja et al., 2010); ikan patin (Sulmartiwi et al., 2011); ikan gabus (Mangkunegara et al., 2019). Keberhasilan penyimpanan spermatozoa ikan terlepas dari peranan larutan ekstender dan larutan krioprotektan. Diantara larutan ekstender yang sudah digunakan untuk pengawetan spermatozoa adalah NaCl (Rahardja et al., 2010), ringer laktat (Gratiana dan Simanjuntak, 2007; Fariedah dan Widodo, 2020), madu (Mangkunegara et al., 2019) dan air kelapa muda (Sulmartiwi et al., 2011). Sedangkan untuk krioprotektan yang banyak digunakan adalah dimetil sulfoksida (DMSO), gliserol, metanol, etilen glikol (EG) dan dimetil asetat (DMA). Beberapa penelitian telah mengkombinasikan antara ekstender dengan krioprotektan, misal ringer-DMSO, ringer-metanol, glukosa-DMSO (Sumarna et al., 2007) dan madu-DMSO (Sumarna et al., 2008), dan madu-gliserol-kuning telur (Mangkunegara et al., 2019). Namun untuk preservasi milt ikan nilam dalam larutan ringer-gliserin belum dilakukan. dengan demikian penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui profil spermatozoa ikan nilam sebelum dan sesudah penyimpanan dalam larutan ringer-gliserin

## **METODELOGI**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam praktikum adalah refrigerator, cawan petri, eppendorf, wadah kultur (baskom), saringan teh, *water bath*, spuit, aerator, mikroskop, *cover glass*, objek gelas, pipet, *stop watch* dan alat tulis. Bahan-bahan yang digunakan meliputi induk ikan nilam dengan bobot  $\pm 150$  g, milt ikan nilam, oosit ikan nilam, medium pengencer sperma (ringer), krioprotektan (gliserin), dan tisu.

### **Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen pada tiga perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak dua belas kali. Perlakuan pertama/kontrol (Po) menggunakan milt segar; perlakuan kedua (P1) menggunakan preservasi spermatozoa pada suhu 4°C dalam larutan ringer-gliserin selama 3 hari; dan perlakuan ketiga (P2) menggunakan preservasi spermatozoa pada suhu 4°C dalam larutan ringer-gliserin selama 7 hari. Variabel yang diamati motilitas dan *fertilization rate* (FR) spermatozoa terhadap oosit segar ikan nilam dan daya tetas telur (HR).

### **Prosedur Penelitian**

#### ***Penyediaan medium***

Medium penyimpanan/pengawet yang digunakan adalah ringer bergliserin 1,5%. Media penyimpanan di buat dengan cara mencampur 75  $\mu$ l gliserin dengan 4925  $\mu$ l ringer sehingga menghasilkan 5 ml gliserin dalam ringer.

#### ***Penanganan milt ikan nilam***

Milt diperoleh dengan cara menginduksi ikan nilam (jantan dan betina) menggunakan hormone GnRH analog dan domperidon 0,5 mL.Kg<sup>-1</sup> secara intramuscular. Setelah 6 jam maka milt diambil dengan cara mengurut perut (*stripping*) ikan jantan secara hati-hati kearah lubang genital hingga keluar cairan putih (milt). Milt yang keluar ditampung dengan spuit, kemudian diencerkan sebanyak 1000x dan langsung dimasukkan dalam medium pengawet yang telah disiapkan dan mencatat waktu pencampuran milt dalam medium.

#### ***Preservasi milt***

Masing-masing milt dalam medium pengawet dimasukkan ke dalam wadah penyimpanan (eppendorf). Selanjutnya eppendorf yang berisi sperma dalam medium pengawet di preservasi kedalam refrigerator untuk disimpan selama tiga dan tujuh hari.

#### ***Pengamatan kualitas spermatozoa dalam milt***

Kualitas spermatozoa kontrol (Po) diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dengan menilai motilitas spermatozoa dalam milt dengan medium penyimpanan masing-masing. Spermatozoa dalam medium ditetaskan pada objek glass, kemudian diaktivasi dengan

setetes air dan diamati motilitasnya. Nilai motilitas diamati dan diberi nilai dalam % (0%-100%) dengan ketelitian 10% yaitu semua spermatozoa bergerak :100%, 80 % bergerak dan 20% diam, 50% bergerak dan 50% diam serta 40% bergerak dan 60% diam. Selanjutnya spermatozoa digunakan untuk memfertilisasi telur (oosit) segar. Telur segar diperoleh dari induk betina ikan nilam matang gonad yang sebelumnya diinduksi dengan hormone GnRH analog dan domperidon 0,5 mL.Kg<sup>-1</sup> secara intramuscular. Setelah tiga jam pencampuran milt dengan telur maka dihitung persentase fertilisasi.

Milt yang telah disimpan pada hari ke-3 dan ke-7, selanjutnya dinilai kualitas spermatozoa. Sebelum dinilai milt paska penyimpanan dalam tabung ependorf dikeluarkan dari refrigerator dan melakukan *thawing* dengan menghangatkan tabung dalam genggam tangan beberapa saat. Setelah mencair kemudian diamati motilitasnya dengan cara mengaktifkan milt dengan air sebanyak satu tetes. Selanjutnya milt dicampurkan dengan telur segar untuk melihat kemampuan fertilisasi sperma setelah penyimpanan selama tiga dan tujuh hari dalam refrigerator.

Evaluasi keberhasilan fertilisasi dengan cara melihat telur hasil fertilisasi dengan ada tidaknya kuncup fertilisasi ataupun blastomer. Sebanyak 100 telur diamati pada masing-masing perlakuan untuk menghitung jumlah telur yang terfertilisasi atau yang tidak terfertilisasi. Prosentase keberhasilan pembuatan dihitung dalam bentuk *fertilization rate* (FR) dengan rumus sebagai berikut:

$$FR = \frac{\text{Jumlah telur terbuahi}}{\text{Jumlah telur yang dibuahkan}} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Rumus 1.}$$

Setelah 3 menit pasca fertilisasi, telur dipindahkan ke wadah kultur untuk diinkubasi sampai menetas dan dihitung derajat penetasan telur (HR) pada masing-masing perlakuan dengan rumus sebagai berikut:

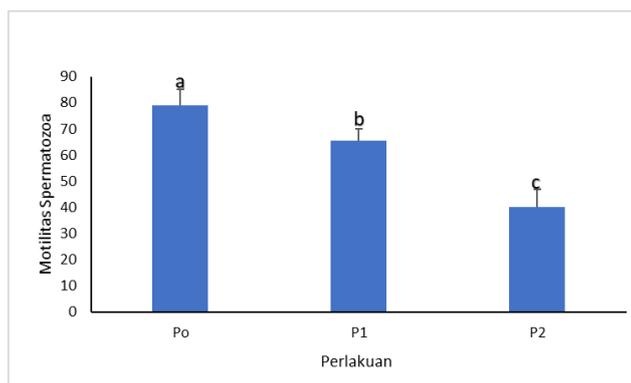
$$HR = \frac{\text{Jumlah telur yang menetas}}{\text{Jumlah telur yang terfertilisasi}} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Rumus 2.}$$

### Analisis Data

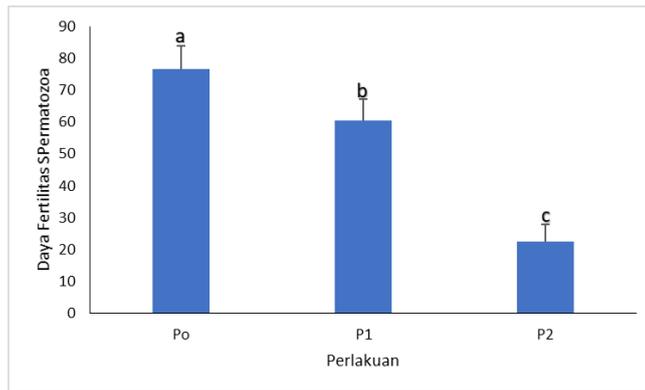
Seluruh variabel dianalisis menggunakan *oneway anova* dengan taraf signifikansi  $\alpha=5\%$ . Hubungan diantara variabel dilakukan uji korelasi dan pengaruhnya dengan uji regresi linear.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

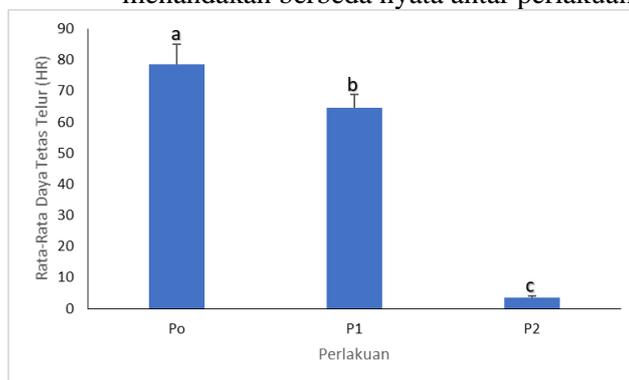
Berdasarkan hasil penelitian diperoleh persentase motilitas sperma sebelum dan sesudah penyimpanan dalam refrigerator, persentase FR masing-masing perlakuan, dan daya tetas telur (HR) masing-masing perlakuan. Secara terperinci disajikan dalam gambar 1 s.d gambar 3.



Gambar 1. Rata-rata ( $\pm$ Standar Dev) prosentase motilitas spermatozoa dari spermatozoa segar (Po) dan setelah disimpan dalam larutan ringer-gliserin secara preservasi pada suhu 4°C selama 3 hari (P1) dan 7 Hari (P2). Huruf yang berbeda menandakan berbeda nyata antar perlakuan pada taraf signifikan 95%.



Gambar 2. Rata-rata ( $\pm$ Standar Dev) prosentase daya fertilitas spermatozoa dari spermatozoa segar (Po) dan setelah disimpan dalam larutan gliserin secara preserervasi pada suhu 4°C selama 3 hari (P1) dan 7 Hari (P2). Huruf yang berbeda menandakan berbeda nyata antar perlakuan pada taraf signifikan 95%.



Gambar 3. Rata-rata ( $\pm$ Standar Dev) prosentase daya tetas telur (HR) spermatozoa dari spermatozoa segar (Po) dan setelah disimpan dalam larutan gliserin secara preserervasi pada suhu 4°C selama 3 hari (P1) dan 7 Hari (P2). Huruf yang berbeda menandakan berbeda nyata antar perlakuan pada taraf signifikan 95%.

Berdasarkan Gambar 1, terlihat bahwa rata-rata motilitas spermatozoa bervariasi antar perlakuan. Motilitas spermatozoa sebelum disimpan dalam refrigerator sebesar 78,83% sedangkan motilitas spermatozoa setelah disimpan selama 3 hari dan 7 hari dalam refrigerator masing-masing sebesar 60% dan 40%. Nilai prosentase motilitas spermatozoa ikan nilam yang disimpan dalam ringer tersebut serupa dengan hasil penelitian pada ikan Gabus (Mangkunegara *et al.*, 2019), dan ikan patin (Fariedah dan Widodo, 2020). Hasil analisis statistik diperoleh bahwa motilitas spermatozoa berbeda signifikan antar perlakuan ( $P < 0,05$ ). Hal tersebut menunjukkan bahwa lama penyimpanan milt dalam ringer-gliserin mempengaruhi prosentasi motilitas spermatozoa. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa lama penyimpanan milt dalam larutan ringer mempengaruhi motilitas ikan nilam (Gratiana dan Simanjuntak, 2006), ikan koi, ikan mas koki dan ikan patin (Fariedah dan Widodo, 2020). Motilitas juga dipengaruhi oleh ekstender yang digunakan misal madu (Sumarna *et al.*, 2007; Rahardja *et al.*, 2010; Mangkunegara *et al.*, 2019), air kelapa muda (Sulmartiwi *et al.*, 2011) dan larutan sari kurma (Fariedah dan Widodo, 2020). Kemampuan motilitas spermatozoa yang disimpan dalam ringer-gliserin menunjukkan bahwa larutan ringer pada milt mampu mempertahankan keseimbangan osmotik spermatozoa dan mampu untuk menunda proses koagulan pada milt. Koagulan yang terbentuk mampu meningkatkan velositas milt sehingga berpeluang untuk memperpendek motilitas dan mengurangi progresivitas spermatozoa (Mochida *et al.*, 1999). Keberadaan larutan ringer sebagai medium pengawet mampu menggantikan plasma milt, dimana larutan ringer berfungsi untuk memberikan sumber energi bagi spermatozoa. Motilitas pada spermatozoa pasca penyimpanan menunjukkan bahwa kemungkinan larutan ringer mampu mempertahankan pH, tekanan osmotik dan kondisi fisiologis. Sebagaimana dijelaskan bahwa aktivitas spermatozoa dipengaruhi pH, tekanan osmotik dan konsentrasi ion dalam seminal atau medium (Hara *et al.*, 1982). Peran pH dalam aktivitas spermatozoa dapat dilihat dari tingkat alkali

dari seminal plasma. Kondisi lingkungan yang lebih alkali akan meningkatkan motilitas spermatozoa. Hal tersebut dikarenakan enzim ATP-ase dan dinein mampu bekerja secara optimal pada kondisi pH 7,8-9 (Zhou *et al.*, 2015).

Tekanan osmotik yang tinggi (400 mOsm/L) akan menghambat motilitas spermatozoa ikan (Morisawa *et al.*, 1983). Motilitas spermatozoa mencapai nol bila tekanan osmotik pengencer 300–380 mOsm/L. Nilai osmolaritas suatu larutan dipengaruhi oleh komposisi media aktivatornya (Aguilar-Juarez *et al.*, 2014; Prastyawan *et al.*, 2015). Osmolaritas yang baik harus lebih rendah dari nilai osmolaritas seminal plasma ikan, sehingga larutan hipotonis akan meningkatkan motilitas spermatozoa (Islam dan Akher, 2011). Sebaliknya jika semakin besar perbedaan nilai osmolaritas antar media penyimpanan dan seminal plasma akan menyebabkan penurunan durasi motilitas (Cabrita *et al.*, 2009). Kandungan larutan ringer seperti ion natrium ( $\text{Na}^+$ ), ion klorida ( $\text{Cl}^-$ ), ion kalium ( $\text{K}^+$ ), ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), laktat dan bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), berfungsi sebagai sumber mineral dan nutrisi untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa dan motilitasnya. Adanya  $\text{Cl}^-$  dapat berperan dalam mempertahankan keseimbangan elektrolit suatu kalsium yang diperlukan oleh tubuh, sedangkan  $\text{Na}^+$  berperan membantu mempertahankan volume dan keseimbangan cairan elektrolit. Natrium dan kalium merupakan kation utama di dalam plasma semen yang berperan dalam mempertahankan keseimbangan elektrolit di dalam semen (Morisawa *et al.*, 1983). Laktat dapat berfungsi untuk sumber energi yang dapat digunakan oleh spermatozoa. Energi yang cukup akan memperpanjang durasi motilitas spermatozoa. Kandungan gula dalam media berfungsi sebagai penyedia cadangan energi bagi spermatozoa, misal sukrosa (Atanasov *et al.*, 2006).

Kemampuan motilitas spermatozoa juga dipengaruhi oleh keberadaan larutan gliserin. Gliserin yang dikombinasikan dengan ringer sebagai krioprotektan memiliki peranan dalam melindungi spermatozoa terhadap kerusakan akibat proses *freezing* maupun *thawing*. Gliserin ini memungkinkan untuk melakukan penetrasi ke dalam sel dan menarik cairan ke luar sel. Proses penyimpanan spermatozoa dalam refrigerator dapat menyebabkan terbentuknya kristal-kristal es di dalam sitoplasma yang akan mengurangi viabilitas spermatozoa. Keberadaan gliserin dimungkinkan dapat mencegah terbentuknya kristal es dan menstabilkan membran plasma spermatozoa selama proses pembekuan. Menurunnya motilitas spermatozoa yang disimpan sampai 7 hari dimungkinkan karena kemampuan gliserin kurang optimal dalam penetrasi ke dalam sel saat proses *freezing*. Krioprotektan yang baik mampu membantu dan mencegah kerusakan sel akibat dehidrasi air setelah meninggalkan sel menuju lingkungan di luar sel (Tiersch, 2006).

Nilai FR dari pengujian kualitas sperma terlihat pada Gambar 2, dimana nilai rata-rata FR bervariasi baik pada pra-penyimpanan sebesar 76,67% dan FR pasca penyimpanan 3 hari dan 7 hari masing-masing sebesar 60,5% dan 22,60%. Hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa nilai FR berbeda nyata diantara semua perlakuan ( $P < 0,01$ ). Nilai FR yang dihasilkan cenderung semakin menurun, hal ini dimungkinkan karena nilai motilitas spermatozoa setelah 7 hari penyimpanan juga semakin menurun. Menurunnya motilitas juga dapat dipengaruhi oleh kadar oksigen yang berperan dalam sintesis ATP di mitokondria spermatozoa. Dalam penelitian ini tidak diberikan suplai oksigen sehingga dimungkinkan bahwa sintesis ATP juga berpengaruh yang akhirnya menyebabkan menurunnya gerakan motilitas spermatozoa. Tinggi atau rendahnya motilitas spermatozoa berpeluang terjadinya kontak antar spermatozoa dengan oosit sehingga fertilisasi terjadi. Hal ini didukung dari nilai korelasi motilitas spermatozoa dengan daya fertilisasi spermatozoa mencapai 0,945 dan motilitas berpengaruh terhadap fertilitas oosit sebesar 0,892 (Tabel.1). Nilai FR yang semakin menurun seiring lama penyimpanan juga dilaporkan pada ikan nilam (Gratiana dan Simanjuntak, 2006). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh komposisi pengencer (ektender) dan krioprotektan belum mampu memberikan viabilitas pada spermatozoa, sehingga dengan demikian perlu diteliti tentang komposisi yang lebih tepat. Namun jika diaplikasikan pada spesies ikan untuk ranah konservasi kemampuan motilitas spermatozoa untuk mempertahankan FR cukup baik.

Tabel 1. Korelasi antar parameter dan nilai koefisien determinasi

NO	Parameter	Korelasi (r)	Koefisien Determinasi (R <sup>2</sup> )	Persamaan Regresi
1	Motilitas Spermatozoa dengan Daya Fertilisasi Spermatozoa	0.945	0.892	$y = -23.13 + 1.85X$

Rata-rata derajat penetasan telur (HR) pada Gambar 3 terlihat bervariasi dan hasil perhitungan statistik berbeda nyata antar perlakuan ( $P < 0,01$ ). Nilai HR dari P0 sebesar 78,60% sedangkan derajat penetasan telur pasca penyimpanan P1 dan P2, masing-masing 64,50% dan 3,5%. Penetasan telur pada perlakuan P3 hampir mendekati 0 atau artinya tidak ada yang menetas, hal ini dapat dikatakan bahwa kualitas spermatozoa dalam penyimpanan ringer-gliserin dapat dipertahankan selama 3 hari.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil di atas maka dapat disimpulkan bahwa spermatozoa yang disimpan secara preservasi pada suhu 4°C dalam larutan ringer-gliserin selama 3 hari masih memiliki kemampuan untuk memfertilisasi oosit segar dan mempertahankan jumlah telur yang menetas.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar-Juárez, M., Ruiz-Campos, G. and Paniagua-Chávez, C.G., 2014. Cold Storage of The Sperm of The Endemic Trout *Oncorhynchus Mykiss Nelsoni*: A Strategy For Short-Term Germplasm Conservation Of Endemic Species. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(1), pp.294-300.
- Atanasov, V., Staikov, Y. and Nikolov, G., 2006. Sperm Diluent VKA-3 for Artificial Propagation of Carps (*Cyprinus carpio* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12(2), p.176.
- Cabrera, E., Robles, V. and Herráez, P. eds., 2008. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine And Freshwater Species*. CRC press.
- Dewi, K dan Soeminto. 2005. Pertumbuhan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) Ginogenesis Sampai Umur 30 Hari Serta Tingkat Perkembangan Gonad Yang Telah Dicapai. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*, 5 (2): 55-59.
- Ergun, AKAY. 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turk Journal Veteriner Animal Science*, 28:837-843.
- Fariedah, F. and Widodo, M.S., 2020. Kombinasi Ekstender Larutan Sari Kurma (*Phoenix dactylifera*) dan Ringer Laktat pada Kualitas Spermatozoa Beberapa Ikan Air Tawar. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), pp.182-188.
- Hara, S., J.T. Canto and J.M.E. Almendras. 1982. A Comparative Study of Various Extender for Milkfish *Chanos-chanos* Forskal, Sperm Preservation. *Aquaculture*, 28: 339-346.
- He, S. and Woods III, L.C., 2003. Effects of Glycine and Alanine on Short-Term Storage and Cryopreservation of Striped Bass (*Morone saxatilis*) Spermatozoa. *Cryobiology*, 46(1), pp.17-25.
- Islam, M.S. and Akhter, T., 2011. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*, 1(1), pp.11-19.
- Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Orfão, L.H., Oliveira, A.V. and Moraes, G.F., 2018. Effects of Cooling and Freezing on Sperm Motility of the Endangered Fish Piracanjuba Brycon Orbignyanus (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction (AR)*, 3(1), pp.55-60.
- Mochida, K., Kondo, T., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K., 1999. A High Molecular Weight Glycoprotein in Seminal Plasma is a Sperm Immobilizing Factor in The Teleost Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Development, growth & differentiation*, 41(5), pp.619-627.
- Morisawa, M.K., H. Suzuki, S. Shimizu, Morisawa and Hasuda. 1983. Effects of Osmolality and Potassium on Motility of Spermatozoa from Freshwater Cyprinid Fishes. *J. Exp. Biol.*, 107: 95- 103.

- Mangkunegara, A.A.A., Dwinanti, S.H. and Syaifudin, M., 2019. The Utilization of Honey as Extender for Stripped Snakehead (*Channa striata*) Sperm Cryopreservation. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 7(2), pp.123-134.
- Prastyawan, S.A., Ducha, N. and Purnomo, T., 2018. Pengaruh Macam Media Aktivator terhadap Motilitas Spermatozoa Ikan Tombro (*Cyprinus carpio*). *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 7(2), 99-103.
- Rahardja, B.S., Mubarak, A.S. and Rini, P.S., 2010. Penambahan Ekstender Madu Dalam Proses Penyimpanan Sperma Beku Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Komet (*Carassius auratus auratus*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 2(2), pp.185-192.
- Stoss, J. and Donaldson, E. M. 1983. Studies on cryopreservation of eggs from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) and Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 31: 51-65.
- Subagja, J, Gustiano R dan Winarlin. 2006. Pelestarian Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) Melalui Teknologi Pembanihannya. *Prosiding Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlingdungan Sumberdaya Genetik di Indonesia*, 300-312.
- Sulmartiwi, L., Ainurrohmah, E. and Mubarak, A.S., 2011. The Effect of Concentration Young Coconut Water and Honey in 0, 9% Sodium Chloride to Motility and Life Time Catfish (*Pangasius pangasius*) Spermatozoa. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3(1), pp.67-72.
- Sunarma, A., Hastuti, D.W.B. and Sistina, Y., 2007. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Shark-minnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). *Prosiding Masyarakat Akuakultur Indonesia*, Surabaya, pp.5-7.
- Sunarma, A., Hastuti, D.W.B., Saleh, D.M. and Sistina, Y., 2008. Kombinasi Efektif Ekstender dan Krioprotektan pada Kriopreservasi Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 10(1), pp.76-84.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research* 31: 231-243.
- Tiersch, T.R., 2006. Fish Sperm Cryopreservation for Genetic Improvement and Conservation in Southeast Asia. Secretariat, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Wijayanti, G.E. and Simanjuntak, S.B., 2006. Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* CV) Setelah Penyimpanan Jangka Pendek dalam Larutan Ringer. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 8(2), pp.207-214.
- Zhou, J., Chen, L.I., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S. and Yao, B., 2015. The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PloS one*, 10(7), p.e0132974.