

Efektifitas Penggunaan Jenis Ekstender dan Dosis Madu Berbeda Terhadap Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan Nilem (*Osteochilus vittatus*) Setelah Penyimpanan
*The Effectiveness of Using Different Types of Extender and Honey Dosage on the Motility and Viability of Nilem Fish Sperm (*Osteochilus vittatus*) After Storage*

Dewi Wisudyanti Budi Hastuti*, Riviani

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

* *Correspondensi:* dewi.wisudyanti@unsoed.ac.id

Received : September 2020

Accepted : December 2020

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis ekstender dan dosis madu berbeda terhadap persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem setelah penyimpanan. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan pola 2 x 3 dan 4 ulangan. Faktor jenis ekstender terdiri atas susu kuning telur dan air kelapa, sedangkan Faktor dosis madu yaitu 0%, 3%, 6%, dan 9%. Parameter utama yang diukur adalah motilitas (%) dan viabilitas (detik) sperma. Parameter pendukung meliputi bau, warna, volume, pH dan viskositas. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik pada taraf kepercayaan 95% menggunakan analisis variansi (ANOVA). Data menunjukkan bahwa semua perlakuan yaitu jenis ekstender, dosis madu dan interaksi antar keduanya memberikan pengaruh yang sama terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem selama penyimpanan.

Kata kunci: sperma nilem, penyimpanan, ekstender berbeda

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of different types of extender and honey dosage on the percentage of motility and viability of nilem fish sperm after storage. This study used a completely randomized design (CRD) factorial pattern with a 2 x 3 pattern and 4 replications. The extender type factors consisted of egg yolk milk and coconut water, while the honey dosage factors were 0%, 3%, 6%, and 9%. The main parameters measured were sperm motility (%) and viability (seconds). Supporting parameters include odor, color, volume, pH, and viscosity. The data obtained were analyzed statistically at the 95% confidence level using analysis of variance (ANOVA). The data showed that all treatments, namely the type of extender, the dose of honey, and the interaction between them had the same effect on the motility and viability of the nilem fish sperm during storage.

Keywords: nilem sperm, storage, different extender

PENDAHULUAN

Ikan merupakan salah satu sumber protein hewani yang makin di gemari oleh masyarakat. Peningkatan permintaan ikan konsumsi sejalan pula dengan peningkatan kebutuhan pasokan ikan ukuran benih. Kebutuhan pasokan benih dapat dipenuhi bila proses produksinya dapat dikontrol dengan baik salah satunya dengan mengatur penjadwalan jumlah induk yang dipijahkan dan waktu pemijahan.

Peningkatan kualitas pasokan benih dapat dilakukan dengan mengupayakan pemijahan induk secara buatan. Keberhasilan pemijahan buatan banyak terfokus pada kualitas telur dari induk betina walaupun kualitas dan kuantitas sperma juga sangat menentukan dalam produksi ikan (Bobe & Catherine, 2010). Penanganan induk jantan yang berulang pada pemijahan buatan dapat mengakibatkan produksi sperma menurun dan tidak mencukupi, ini bisa

dikarenakan musim pemijahan ataupun jumlah jantan yang lebih sedikit dengan jumlah betina (Mylonas *et al.*, 2010). Akibat adanya penurunan kualitas tersebut, penyimpanan sperma merupakan jalan yang bisa ditempuh.

Beberapa keuntungan penyimpanan sperma antara lain memungkinkan untuk sinkronisasi ketersediaan gamet jantan dan betina, memanfaatkan semua sperma yang tersedia terutama pada spesies dengan produksi sperma yang rendah, memudahkan transport gamet, memudahkan upaya ferlisasi silang untuk spesies yang tidak memiliki waktu pemijahan bersamaan, untuk konservasi keanekaragaman hayati, seperti meminimalkan perkawinan sedarah dan mengurangi seleksi domestikasi (Cabrita *et al.*, 2010; Sunarma *et al.*, 2010; Asturiano *et al.*, 2017; Martínez-Páramo *et al.*, 2017; Di Iorio *et al.*, 2019)

Ikan nilam dipilih sebagai obyek dalam penelitian ini yang diharapkan hasilnya bisa diterapkan pada ikan famili cyprinidae yang lain seperti ikan mas (*Cyprinus carpio*). Pemilihan ikan ini juga didasarkan atas ukuran ikan yang relatif kecil, memiliki daya tahan baik, siklus hidup pendek dan dapat dipelihara dalam kondisi laboratorium. Bahan pengencer, rasio pengenceran, bahan pelindung, laju pembekuan dan laju pencairan kembali merupakan beberapa faktor penentu keberhasilan preservasi sperma (Agarwal, 2011; Murgas *et al.*, 2014). Bahan pengencer yang baik untuk media penyimpanan sperma adalah yang dapat mensuplai nutrisi sebagai sumber energi dan bersifat isotonik untuk menjaga keseimbangan elektrolit serta mempertahankan tekanan osmotik agar tetap sesuai dengan seminal plasma (Betsy & Kumar, 2020).

Penggunaan kombinasi ekstender susu, kuning telur dan gliserol (Novianto *et al.*, 2014), air kelapa dan madu (Sulmartiwi *et al.*, 2011) serta air kelapa dan gliserol (Kurniawan *et al.*, 2013; Untsa, 2018) dilaporkan efektif sebagai media simpan sperma ikan.

Glukosa, protein serta vitamin yang larut dalam lemak terkandung dalam susu yang

nantinya dapat menguntungkan bagi sel spermatozoa (Widjaya, 2011). Selain itu juga mengandung beberapa ion diantaranya yaitu natrium (Na^+) dan kalium (K^+). Sedangkan, lipoprotein dan lesitin yang terdapat dalam kuning telur dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari suhu dingin (Permatasari *et al.*, 2013). Sedangkan, karbohidrat ditemukan dalam air kelapa (Hine *et al.*, 2014) yang dapat dimanfaatkan sebagai energi oleh sperma selama penyimpanan.

Sementara, monosakarida yang terkandung dalam madu sangat dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menjaga kelangsungan hidupnya selama penyimpanan. Madu juga berfungsi sebagai sumber energi/nutrisi (Arfah *et al.*, 2015) serta sebagai *buffer* untuk mempertahankan pH sperma dalam kondisi normal (Sulmartiwi *et al.*, 2011).

Berdasarkan data United States Department of Agriculture (USDA) yang dikemukakan oleh Rahardhianto *et al.*, (2012), madu mengandung 69% monosakarida; 17,1% air; 7,2% maltose, 4,2% trisakarida dan beberapa polisakarida, 1,5% sukrosa; 0,5% vitamin, mineral dan enzim. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstender berbeda yaitu susu + kuning telur dan air kelapa dengan kombinasi dosis madu berbeda terhadap persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan nilam (*Osteochilus vittatus*).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, sperma dari induk ikan nilam yang telah matang gonad, hormon sGnRH α (ovaspec), minyak cengkeh dan es batu yang sudah dicacah menjadi potongan kecil susu kemasan *plain* putih cair, kuning telur, air kelapa muda dan madu.

Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini yaitu, bak kontainer, aerator, lap kain, spuit 1 mL, botol vial 20 mL, kotak *styrofoam*, timbangan digital, *microtube* 1,5 mL,

micropipette, *Chest Freezer/RSACF-150*, *CAP 150*; termometer; *Objek glass* dan Mikroskop Olympus CX33, *stopwatch*.

Penelitian dilakukan secara eksperimental berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 4 ulangan dengan pola 2 x 3. Faktor jenis ekstender (A) terdiri atas susu kuning telur dan air kelapa sedangkan, faktor dosis madu (B) yaitu 0%, 3%, 6%, dan 9% sehingga total ada 24 kombinasi perlakuan. Parameter utama yang diukur adalah persentase motilitas (%) dan viabilitas (detik) sperma. Parameter pendukung meliputi bau, warna, volume, pH dan viskositas.

Persiapan Sperma dari Induk

Ikan nilem jantan disuntik dengan ovaspec sebanyak 0,3 mL/kg. Setelah terlihat gejala mijah kurang lebih 12 jam, ikan dibius dengan minyak cengkeh. Ikan yang sudah pingsan diambil spermanya dengan metode *stripping* secara perlahan pada daerah perut kearah anal sampai keluar sperma ikan. Sperma yang sudah didapatkan lalu ditampung pada mangkuk dan dilakukan pemeriksaan sperma segar secara mikroskopis dan makroskopis. Pengamatan mikroskopis berupa presentase pergerakan (motilitas) spermatozoa dan penentuan lama waktu hidup (viabilitas) spermatozoa. Pengamatan makroskopis meliputi bau, warna, volume, pH dan viskositas (Dwitarizki *et al.*, 2015).

Persiapan larutan ekstender

Ekstender dengan kombinasi susu kemasan cair, kuning telur dari ayam petelur, air kelapa muda dan madu. Ekstender dengan bahan dasar susu dan kuning telur kemudian ditambahkan madu dengan konsentrasi 3%, 6% dan 9% dari total volume. Begitu pula dengan ekstender berbahan dasar air kelapa juga ditambahkan madu dengan konsentrasi 3%, 6% dan 9% dari total volume. Larutan ekstender kemudian disimpan pada suhu 4°C apabila belum akan digunakan.

Penyimpanan Spermatozoa

Penyimpanan spermatozoa dengan memasukkan sebanyak 0,1 mL sperma dan

ditambahkan ekstender 0,9 mL kedalam *microtube* dengan menggunakan spuit. Penyimpanan sperma dimasukkan ke dalam *Freezer* dengan suhu -20°C selama 7 hari.

Pengumpulan data

Pengamatan kualitas sperma ikan nilem dilakukan dengan mikroskop. Sperma yang telah disimpan dalam *freezer* selama 7 hari kemudian diambil dan dibiarkan mencair dalam suhu ruang. Aktivasi sperma dilakukan dengan menambahkan larutan aktivator (45 mM NaCl, 5 mM KCL dan 30 mM TRIS dalam 100 mL aquadest) (Sunarma *et al.*, 2010) dengan perbandingan 1:1, kemudian sampel sperma diambil menggunakan pipet dan teteskan pada *object glass* untuk dilakukan pengamatan presentase motilitas dan viabilitas sperma dibawah mikroskop Olympus CX33. Metode yang digunakan dalam evaluasi motilitas spermatozoa pada penelitian ini adalah metode evaluasi subjektif yaitu ditentukan berdasarkan pergerakan sperma setelah diaktifasi. (Sunarma *et al.*, 2010; Kurniawan *et al.*, 2013). Pengamatan daya tahan hidup spermatozoa dilakukan dengan mencatat waktu viabilitas (menit) yaitu mulai bergerak lamban, bergerak berputar ditempat (*reservoir*), berdenyut lemah sampai tidak berdenyut lagi atau mati (Hidayaturrahmah, 2007)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis sperma segar ikan nilem (*O. vittatus*) disajikan pada Tabel 1:

Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis sperma segar.

No	Pengamatan	Keterangan
1.	Bau	Khas sperma/ Amis
2.	Warna	Putih susu
3.	Volume	2,8 mL
4.	pH	8
5.	Kekentalan	Kental
6.	Motilitas (%)	80%
7.	Viabilitas (detik)	120 detik

Sperma segar ikan nilem yang digunakan dalam penelitian ini sudah sesuai dengan persyaratan untuk preservasi. Hal ini dapat dilihat dari persentase motilitas yang $\geq 80\%$ dan nilai pH 8. Sesuai dengan Devi *et al.*, (2019) yang menyatakan bahwa kondisi interval pH normal untuk ikan *cyprinidae* adalah 7,5-8

Persentase motilitas spermatozoa pasca penyimpanan dalam jenis ekstender dan dosis madu berbeda tersaji pada Tabel.2 dan Gambar 1 yang menunjukkan rentang nilai antara 11% - 53.3%. Pada perlakuan ekstender susu + kuning telur persentase motilitas tertinggi terlihat pada perlakuan ekstender susu + kuning telur dengan dosis madu 6% yaitu 53.3% sedangkan, pada perlakuan ekstender air kelapa persentase motilitas tertinggi terlihat pada perlakuan ekstender air kelapa tanpa dan dengan dosis madu 6% yaitu 25%. Walaupun demikian hasil dari analisis variansi menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0.05$).

Perlakuan jenis ekstender, dosis madu dan interaksi antar keduanya memberikan respon yang sama untuk persentase motilitas sperma setelah penyimpanan.

Berikutnya, viabilitas spermatozoa pasca penyimpanan dalam jenis ekstender dan dosis madu berbeda tersaji pada Tabel. 2 dan Gambar. 2 yang menunjukkan rentang nilai antara 6.6 detik–15.6 detik. Persentase motilitas tertinggi terlihat pada perlakuan ekstender susu + kuning telur dengan dosis madu 6% yaitu 15,6 detik. Sedangkan, pada perlakuan ekstender air kelapa persentase motilitas tertinggi terlihat pada perlakuan ekstender air kelapa dengan dosis madu 6% yaitu 14 detik. Walaupun demikian hasil dari analisis variansi menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0.05$) untuk semua perlakuan.

Sifat ekstender yang baik adalah isotonik, memiliki kapasitas buffer yang baik, mengandung nutrisi sebagai sumber energi, bersifat antioksidan dan antibacterial (Agarwal, 2011). Ekstender diharapkan juga tidak hanya sebagai media pengencer dan pelindung sperma tetapi juga harus mampu berfungsi sebagai

pengontrol kondisi pH dan penyedia sumber nutrisi bagi spermatozoa sehingga fungsi dan kapabilitas sperma dapat dipertahankan (Tiersch, 2006 dalam Mangkunegara *et al.*, 2019).

Madu yang ditambahkan dalam ekstender diharapkan dapat mempertahankan kemampuan motilitas dan memperpanjang daya hidup spermatozoa selama penyimpanan. Pernyataan ini didukung dari beberapa hasil penelitian yang relevan diantaranya adalah Mangkunegara *et al.*, (2019) yang melaporkan bahwa madu digunakan sebagai ekstender pada kriopreservasi ikan gabus berhasil mempertahankan motilitas, viabilitas serta melindungi spermatozoa dari kerusakan atau kelainan. Demikian pula yang dilaporkan oleh Sunarma *et al.*, (2010) bahwa kombinasi ekstender madu menghasilkan rata-rata motilitas spermatozoa 63,33% pasca kriopreservasi.

Perlakuan jenis ekstender, dosis madu dan interaksi antar keduanya memberikan respons yang sama untuk viabilitas sperma setelah penyimpanan.

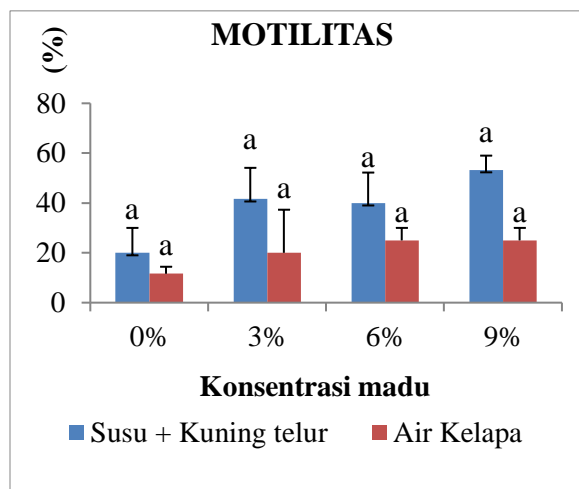
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jenis ekstender baik susu dan kuning telur maupun air kelapa mampu mempertahankan motilitas serta viabilitas spermatozoa ikan nilem setelah penyimpanan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Anindita (2010) yang melaporkan bahwa pemberian susu skim dengan konsentrasi 15% mampu menghasilkan persentase motilitas 80,98% dan viabilitas 84% pasca kriopreservasi sperma ikan gurami, begitu pula dengan hasil yang dilaporkan novianto *et al.*, 2014 bahwa penggunaan susu skim, kuning telur dan dosis madu berbeda mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan patin pasca kriopreservasi.

Susu menyediakan zat-zat energi bagi spermatozoa sedangkan, kuning telur mengandung lecitin dan lippoprotein yang dapat digunakan sebagai bahan penyangga (*buffer*) sperma dan mencegah terjadinya

Tabel 2. Persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem setelah penyimpanan

Konsentrasi Madu	Motilitas (%)		Viabilitas (detik)	
	Susu + Kuning telur	Air Kelapa	Susu + Kuning telur	Air Kelapa
0%	40 ± 12.2 ^a	25 ± 5 ^a	11 ± 2.9 ^a	10.6 ± 4 ^a
3%	41.6 ± 12.5 ^a	20 ± 17.3 ^a	9.6 ± 3.2 ^a	9 ± 3 ^a
6%	53.3 ± 5.7 ^a	25 ± 5 ^a	15.6 ± 4.5	14 ± 3.6 ^a
9%	20 ± 10 ^a	11.6 ± 2.8 ^a	7.3 ± 2.5 ^a	6.6 ± 2.8 ^a

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada pengaruh nyata dari perlakuan (P>0.05).

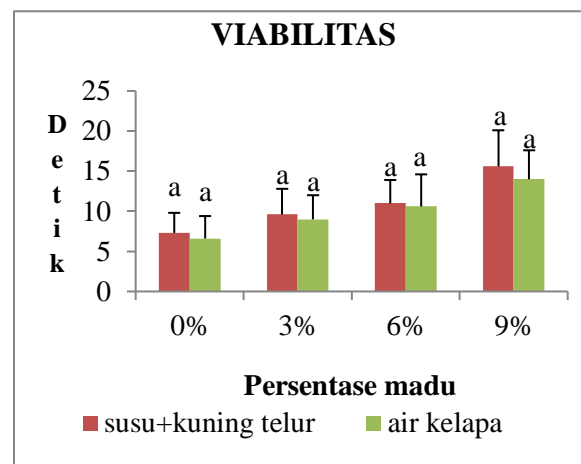


Gambar 1. Grafik persentase motilitas sperma ikan nilem pada semua perlakuan selama penyimpanan.

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada pengaruh nyata dari perlakuan (P>0.05).

coldshock akibat penurunan temperatur yang mendadak bagi spermatozoa selama penyimpanan (Widjaya, 2011).

Penggunaan air kelapa sebagai ekstender juga banyak dilaporkan. Sulmartiwi *et al.*, (2011) melaporkan bahwa air kelapa muda dengan konsentrasi 99,4% dan madu 0,6% bisa meningkatkan lama hidup spermatozoa ikan patin selama penyimpanan. Penggunaan dosis air kelapa 50% dan gliserol 50% juga dilaporkan mampu mempertahankan motilitas spermatozoa ikan mas pasca penyimpanan (Kurniawan



Gambar 2. Grafik viabilitas sperma ikan nilem pada semua perlakuan selama penyimpanan.

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada pengaruh nyata dari perlakuan (P>0.05).

et al., 2013). Tingkat abnormalitas spermatozoa ikan mas terendah sebesar 7,96% dihasilkan dari penggunaan kombinasi ekstender 70% air kelapa, 20% kuning telur dan 10 % gliserol (Rohmah *et al.*, 2020)

Penambahan madu dalam ekstender akan memberikan energi bagi spermatozoa selama penyimpanan karena mengandung gula sederhana (monosakarida) yaitu fruktosa dan glukosa. Manfaat penambahan fruktosa dan glukosa dalam ekstender adalah untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa

pasca pengenceran, karena proses pembentukan Adenosin Trifosfat (ATP) dan Adenosin Difosfat (ADP) harus terus berjalan agar motilitas dapat terus berlangsung (Tumanung *et al.*, 2015). Hal ini diperkuat dengan pernyataan Adalina (2017) yang menyebutkan bahwa madu mengandung monosakarida yaitu 40,73% fruktosa dan 27,11% glukosa.

Pengamatan motilitas merupakan parameter penting yang digunakan untuk menentukan kualitas spermatozoa. Faktor lingkungan seperti jenis pengencer, zat kimia penyusun ekstender, pH, dan osmolaritas berpengaruh pada persentase motilitas yang dihasilkan. (Urabi *et al.*, 2019).

Pergerakan spermatozoa sangat berperan penting terhadap fertilisasi. Spermatozoa yang dikategorikan motil merupakan spermatozoa yang bergerak di tempat, ke depan maupun tidak lurus (Anindita, 2010). Menurut Bozkurt *et al.*, (2009) dalam Devi *et al.*, (2019) bahwa walaupun berasal dari spesies ataupun individu yang sama tetapi motilitas spermatozoa ikan dapat berbeda. Hal tersebut dikarenakan kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya usia, ukuran, dan kondisi fisiologis ikan. Persentase motilitas yang berbeda juga dapat disebabkan oleh metode pengamatan yang digunakan. Metode pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode subjektif. Oleh karena itu, perbedaan dalam interpretasi data yang diperoleh sangat mungkin terjadi dikarenakan faktor subjektivitas dan pengalaman peneliti.

Viabilitas merupakan durasi dari pergerakan progresif yang diukur dengan satuan waktu (detik). Pengamatan viabilitas berguna untuk mengetahui sampai berapa lama spermatozoa hidup (*viable*) atau tidak hidup (*unviable*) yang dilihat dari pergerakan spermatozoa (Adipu *et al.*, 2011; Fauvel *et al.*, 2010; Cosson, 2019).

SIMPULAN

Penggunaan susu dan kuning telur juga air kelapa yang dikombinasikan dengan dosis

madu berbeda sebagai bahan pengencer menunjukkan pengaruh yang sama terhadap persentase motilitas dan viabilitas sperma ikan nilem (*O. vittatus*) setelah penyimpanan.

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut tentang pengaruh dari kematangan spermatozoa, rasio pengenceran, dan kombinasi ekstender yang tepat sesuai komposisi seminal plasma dari sperma ikan nilem (*O. vittatus*).

DAFTAR PUSTAKA

- Adalina, Y. (2017). *Kualitas Madu Putih Asal Provinsi Nusa Tenggara Barat. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 3(2):189-193.
- Adipu, Y., H. Sinjal & J. Watung. (2011). *Ratio Pengenceran Sperma Terhadap Motilitas Spermatozoa Fertilisasi dan Daya Tetas Telur Ikan Lele. Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*, 7(1), 48-55.
- Agarwal, N. K. (2011). *Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation & New Tools in Biotechnology*. Editors: Madhu Thapliyal, Ashish Thapliyal, J.P. Bhatt. Transmedia Publication, 978-81-904778-3-6, 2011, pp. 104-127.
- Arfah, H., Hasan, F., Setiawati, M. (2015). *Pemberian berbagai jenis madu dengan rasio pengenceran berbeda terhadap kualitas sperma Pangasianodon hypophthalmus. Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14(2), 164–170.
- Anindita, I. (2010). *Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Susu Skim Terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Gurami (Osphronemus gouramy, Lacepede 1801) Dua Hari Pasca kriopreservasi*. Skripsi. Universitas Indonesia.
- Asturiano, J. F., Cabrita E, Horváth Á. (2017). *Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: A mini-review. General and Comparative Endocrinology*, 245, 69-76.
- Betsy, J & Thilak Pon Jawahar K. (2020) *Cryopreservation of Fish Gametes: An*

- Overview. In: Betsy J., Kumar S. (eds) Cryopreservation of Fish Gametes. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_7.
- Bobé, J & Labbé C. (2010). *Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology*. 165(3). 535-548.
- Cabrita, E., Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez Cerezales S, Herráez M. P. (2010). *Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623 – 635.
- Cosson, J., (2019). *Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation, Biological Research in Aquatic Science*, Yusuf Bozkurt, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen. 85139
- Devi, O. S., Susilowati T, Nugroho R. A., (2019). *Pengaruh penambahan madu dengan dosis berbeda dalam media pengencer nacl fisiologis terhadap kualitas sperma ikan tawes (Barbonymus gonionotus). Jurnal Sains Akuakultur Tropis*, 3(2), 21-30.
- Di Iorio, M., Esposito S, Rusco G, Roncarati A, Miranda M, Gibertoni, P. P., Cerolini S, Iaffaldano N. (2019). *Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise-Italy): comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. Sci Rep* 9, 9703 doi:10.1038/s41598-019-45006-4.
- Dwitarizki, N. D., Ismaya, Asmarawati, W. (2015). *Pengaruh pengenceran sperma dengan air kelapa dan aras kuning telur itik serta lama penyimpanan terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa domba garut pada penyimpanan 5°C. Buletin Peternakan*, 39 (3),49-56.
- Fauvel, C., Suquet M, Cosson J. (2010). *Evaluation of fish sperm quality. Journal of Applied Ichthyology*. 26 (5), 636–643.
- Hidayaturrehman. 2007. *Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (Cyprinus carpio L.) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa. Bioscientiae*, 4 (1), 9-18.
- Hine, T. M., Burhanuddin, Marawali A. (2014). *Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. Jurnal Veteriner*, 15(2), 263-273.
- Kurniawan, I. Y., Basuki F., Susilowati T. (2013). *Penambahan Air Kelapa Dan Gliserol Pada Penyimpanan Sperma Terhadap Motilitas dan Fertilitas Spermatozoa Ikan Mas (Cyprinus carpio L.). Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(1), 51-65.
- Martínez-Páramo S., Horváth Á, Labbé C, Zhang T, Robles V, Herráez P, Suquet M, Adams S, Viveiros A, Tiersch T. R., Cabrita E. (2017). *Cryobanking of aquatic species. Aquaculture*, 472, 156-177.
- Mangkunegara, A.A., S. H. Dwinanti, M. Syaifudin. (2019). *Pemanfaatan madu sebagai bahan ekstender untuk kriopreservasi sperma ikan gabus (Channa striata). Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 7(2): 123 – 134.
- Murgas, L. D. S., V. O. Felizardo, E. S. Andrade, M. R. Ferreira, D. A. J. Paula, A. F. S. Carvalho. (2014). *Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory freshwater fish. In book: Recent Advances in Cryopreservation. Chapter: 4. Intech Open, Brasil.*
- Mylonas, C.C, Fostier A, Zanuy S. (2010). *Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology*, 165 (3), 516-534.
- Novianto, B. R., Sudarno, Masithah E D. (2014). *Pengaruh perbedaan konsentrasi gliserol dalam susu skim kuning telur untuk proses penyimpanan sperma beku terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan patin (Pangasius*

- pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 6 (1), 1-6.
- Permatasari, W.D., E.T. Setiatin. & D. Samsudewa. (2013). *Studi Tentang Pengencer Kuning Telur dan Pengaruhnya Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Brebes*. *Animal Agricultural Journal*, 2(1), 143-151.
- Rahardhianto, A., Abdulgani, N., & Trisyani, N. (2012). Pengaruh Konsentrasi Larutan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Viabilitas dan Motilitas Masa Penyimpanan. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 1(1), 58–63.
- Rohmah, Q., Hari Santoso, Hasan Zayadi. (2020). *Pengaruh kombinasi bahan pengencer air kelapa, kuning telur dan gliserol terhadap normalitas spermatozoa ikan mas (Cyprinus carpio L)*. *e-Jurnal Ilmiah Sains Alami*, 2 (2), 28-38.
- Sulmartiwi, L., Ainurrohmah, Eka & A. Shofy Mubarak. (2011). *Pengaruh Konsentrasi Air Kelapa Muda dan Madu dalam NaCl Fisiologis terhadap Motilitas dan Lama Hidup Spermatozoa Ikan Patin (Pangasius pangasius)*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3 (1), 67-71.
- Sunarma, A., Budihastuti, D. W. & Sistina, Y., (2010). *Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteichilus hasseltii* Valenciennes, 1842)*, *Omni Akuatika*, 9(11), 51–55.
- Tumanung, S, Sinjal, H.J, Watung, J.C. (2015). *Penambahan Madu Dalam Pengenceran Sperma Untuk Meningkatkan Motilitas, Fertilisasi dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (Cyprinus carpio L)*. *Jurnal Budidaya Perairan*, 3(1), 51-58.
- Untsa, A. T. (2018). Penyimpanan Sederhana Sel Sperma Menggunakan Kombinasi Air Kelapa dan Gliserol Terhadap Motilitas dan Viabilitas Sperma Ikan Koi (*Cyprinus carpio*). Skripsi. Universitas Muhammadiyah Malang.
- Urabi, D., Farida F, Lestari, T. P. (2019). *Pengaruh Penambahan Madu Pada Pengenceran Sperma Terhadap Motilitas Spermatozoa Ikan Baung (Mystus nemurus)*. *Jurnal Ruaya*, 7(2), 47-54.
- Widjaya, N. (2011). *Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi Pada Suhu Penyimpanan 5°C*. *Sains Peternakan*, 9 (2), 72-76.