

Full Paper**VIABILITAS SPERMA IKAN NILEM (*Osteochilus hasselti* C.V.) SETELAH PENYIMPANAN JANGKA PENDEK DALAM LARUTAN RINGER****VIABILITY OF SPERM OF NILEM (*Osteochilus hasselti* C.V.) AFTER A SHORT-STORAGE IN RINGER SOLUTION**Gratiana E. Wijayanti^{*)} dan Sorta B.I. Simanjuntak^{**)}**Abstract**

The success of induced breeding relies on the availability of viable sperm and eggs. Meanwhile information on viability of post-stripped sperm of the nilem is still limited. This experimental study was conducted to find out the duration of sperm storage that maintains sperm viability. The nilem's milt was diluted in Ringer solution at 0, 10, 100 and 1,000 dilution and kept in the refrigerator (4°C) for 3, 6 and 9 days. The sperm viability was assessed by its motility, progressivity and ability to fertilize fresh eggs. The results showed that the sperm were immotile in either undiluted or diluted in Ringer solution. Upon activation by diluting in water, the sperm of the control groups as well as the tested groups showed a high motility (>70%) and highly progressive (>3). The sperm were capable to fertilize eggs as indicated by a high fertilization rate of more than 90%. The highest hatching rate (HR) was produced by the control groups while HR of milt stored for 3, 6 and 9 days were 60%, 1% and 0%, respectively. Low HR produced by milt stored for 6 and 9 days was resulted from a high proportion of abnormal embryos which led to their mortality around gastrula stage. It could be concluded that the viability of the nilem's sperm could be diluted in Ringer solution and kept in the refrigerator as long as for 3 days.

Key words: sperm storage, sperm motility, fertility, nilem (*Osteochilus hasselti* C.V.)**Pengantar**

Pembuahan buatan telah banyak diterapkan dalam usaha pembenihan ikan. Hal ini disebabkan adanya beberapa keuntungan yang diperoleh dari metode tersebut diantaranya: jadwal pelaksanaannya dapat diatur sesuai dengan kebutuhan, media pembuahannya dapat diatur, hasil pembuahannya lebih mudah dikontrol agar larva yang dihasilkan dapat terhindar dari faktor-faktor yang merugikan sehingga jumlah benih yang dihasilkan menjadi lebih banyak dibandingkan dengan pembuahan alami. Disamping itu pembuahan buatan juga memberi pemecahan terhadap masalah keterbatasan sarana pemijahan

alami seperti irigasi yang kurang lancar dan keterbatasan lahan misalnya ketiadaan kolam pemijahan alami (Wijayanti *et al.*, 1995).

Keberhasilan pembuahan buatan pada ikan sangat dipengaruhi oleh faktor eksternal maupun faktor internal. Faktor eksternal misalnya media pembuahan dan penetasan, sedangkan faktor internal antara lain viabilitas dan kualitas telur dan sperma. Kemajuan teknologi yang ada pada saat ini, telah memungkinkan untuk mengatur temperatur, pH, kandungan oksigen terlarut ataupun salinitas pada media sehingga kondisi optimum untuk pembuahan, penetasan dan pemeliharaan larva dapat dipersiapkan

^{*)} Lab. Struktur dan Perkembangan Hewan Fakultas Biologi UNSOED, Jl. Dr. Suparno No 63 Karangwangkal Purwokerto 53123. Tlp: (0281) 638794, Fax: (0281) 631700.

^{**)} Lab Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UNSOED, Jl. Dr. Suparno No 63 Karangwangkal Purwokerto 53123.

^{*)} Penulis untuk korespondensi, E-mail: gratiana_wij@lycos.com

sebaik mungkin. Dengan demikian, perhatian peneliti saat ini lebih ditujukan kepada viabilitas telur dan sperma yang akan dibuahkan.

Viabilitas sperma ikan dapat diukur dari motilitas dan kemampuannya untuk membuahi telur (fertilitas). Motilitas merupakan persyaratan utama yang menentukan fertilitas sperma (Billard, 1978; Stoss, 1983). Motilitas sperma dapat dievaluasi dengan mengukur beberapa parameter motilitas meliputi lama motilitas (Billard, 1986) dan persentase motilitas (Billard & Cosson, 1992; Cosson *et al.*, 1999; Ingermann *et al.*, 2002). Sperma ikan pada umumnya tidak motil pada saat masih berada di dalam testis dan di dalam seminal plasma (Stoss, 1983; Billard, 1986). Lama motilitas sperma pada kondisi *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti konsentrasi ion (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), tekanan osmotik, pH, suhu dan pengenceran (Stoss, 1983; Cosson *et al.*, 1999).

Fertilitas sperma ikan yang fertilisasinya berlangsung secara eksternal pada umumnya hanya berlangsung pada waktu yang singkat. Hal ini disebabkan oleh pendeknya periode motilitas sperma di perairan. Penurunan motilitas dan progresivitas sperma pada umumnya mengakibatkan penurunan fertilitas sperma (Jeziarska & Witeska, 1999). Untuk memperpanjang viabilitas sperma maka dikembangkan metode pengawetan sperma pada temperatur rendah dengan penambahan krioprotektan. Metode ini telah diterapkan untuk mengawetkan sperma ikan sturgeon di Rusia dan Ukraina (Billard *et al.*, 2004). Meskipun metode ini cukup efektif namun dalam pelaksanaannya memerlukan peralatan spesifik seperti kemasan penyimpanan (*straw*), tabung nitrogen cair serta penggunaan krioprotektan sehingga metode ini kurang praktis untuk diterapkan oleh petani atau dalam keadaan darurat.

Metode penyimpanan yang lebih praktis adalah dengan penyimpanan sperma pada suhu di atas titik beku dan tanpa penambahan krioprotektan. Sperma dapat disimpan dengan atau tanpa ekstender. Ekstender yang digunakan antara lain medium Hank's dan Munib's (Park & Chapman, 2005), dan larutan Ringer (Billard *et al.*, 2004). Metode ini telah berhasil memperpanjang viabilitas sperma ikan subtropis seperti rainbow trout (McNiven *et al.*, 1993), striped bass (Kavamoto *et al.*, 2001) dan sturgeon (Park & Chapman, 2005). Meskipun teknik ini sangat relevan untuk tatalaksana reproduksi ikan namun penggunaan teknik ini belum banyak digunakan dalam usaha budidaya ikan-ikan tropis (Marques & Godinho, 2004). Sperma ikan mas yang disimpan dalam larutan Ringer + 1% gliserin selama 5 hari masih mampu mempertahankan fertilitasnya hingga 61,4% (Sensusinawati, 1983). Penelitian pendahuluan pada ikan nilam menunjukkan bahwa sperma masih memiliki fertilitas hingga 60% setelah disimpan tanpa ekstender selama 30 menit pada suhu ruang (Wijayanti *et al.*, 1997). Penambahan larutan Ringer (1:100, v:v) pada sperma nilam yang disimpan selama 2 jam pada suhu ruang mampu mempertahankan fertilitas sperma hingga $51,88\% \pm 2,5$ (Martini, 1998). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa suhu penyimpanan mempengaruhi lama motilitas sperma (Jeziarska & Witeska, 1999). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui viabilitas sperma nilam setelah disimpan dalam refrigerator dengan penambahan larutan Ringer pada beberapa tingkat pengenceran.

Bahan dan Metode

Sperma yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari enam ikan nilam seruni yang telah matang gonad dengan berat tubuh ± 100 g. Kematangan gonad ditandai dengan mudahnya milt keluar pada saat dilakukan pengurutan secara halus. Untuk meningkatkan jumlah milt, induk nilam jantan diinduksi dengan

ovaprim 0,5 ml.kg⁻¹ (Cyndel Laboratory, Vancouver, Canada) secara intramuskuler 5 jam sebelum dilakukan pengambilan milt.

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola faktorial. Faktor pertama yang diuji adalah tingkat pengenceran milt yang terdiri atas 0, 10, 100 dan 1000 kali; dan faktor kedua adalah lama penyimpanan milt yang terdiri atas 0, 3, 6 dan 9 hari; dengan demikian terdapat 16 kombinasi perlakuan masing-masing dengan 6 ulangan. Variabel yang diamati adalah viabilitas sperma dengan parameter berupa persentase motilitas, progresivitas dan lama motilitas sperma; kemampuan sperma setelah penyimpanan untuk membuahi telur segar dan menghasilkan larva.

Pengambilan milt

Pengeluaran milt dilakukan melalui pengurutan. Daerah di sekitar lubang genital dibersihkan menggunakan kain halus kemudian dinding abdomen diurut secara halus ke arah lubang genital dan milt yang keluar diambil menggunakan spuit tanpa jarum. Pengambilan milt dilakukan sedemikian rupa sehingga kontaminasi oleh urin, faeces, darah ataupun air dapat dicegah. Pengujian adanya kontaminasi dilakukan dengan mengamati setetes milt segar dari masing-masing sample di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400x (Marques and Godinho, 2004). Sampel sperma yang tidak memperlihatkan motilitas ditetapkan sebagai tidak terkontaminasi sehingga digunakan dalam penelitian.

Penyimpanan milt

Milt dari masing-masing induk dibagi menjadi 4 bagian masing-masing sebanyak 0,3 ml. Bagian pertama disimpan tanpa pengenceran, sedangkan bagian ke 2, 3 dan 4 diencerkan dengan larutan Ringer (CV Kerabat, Semarang, Jateng) berturut-turut 10, 100 dan 1000 kali. Keempat kelompok sampel disimpan

di dalam refrigerator pada suhu 4°C selama 9, 6, 3 dan 0 hari tanpa penambahan oksigen.

Uji motilitas dan progresivitas sperma

Pada akhir masing-masing periode penyimpanan dilakukan evaluasi terhadap persentase motilitas, progresivitas dan lama motilitas sperma. Lama motilitas sperma dihitung segera setelah sperma diaktivasi dengan menambahkan air (1:1, v/v) hingga tidak lagi tampak adanya sperma yang motil (Alvi *et al.*, 2004). Pengamatan motilitas sperma dilakukan *duplo* di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x, pada temperatur ruang (25-27°C).

Uji fertilitas sperma setelah penyimpanan

Fertilitas sperma dilakukan melalui pembuahan antara sperma yang telah disimpan dan sperma segar dengan telur segar. Telur segar diperoleh dengan menstripping induk nilam betina matang gonad yang telah diinduksi dengan ovaprim 0,5 ml.kg⁻¹ (Cyndel Laboratory, Vancouver, Canada) secara intramuskuler. Telur sebanyak 300 butir per ulangan dan sperma dibuahkan dengan metode basah. Keberhasilan pembuahan diamati 30 menit setelah pencampuran sperma dan telur. Telur dikatakan terbuahi apabila pada saat evaluasi terdapat dua blastomer pada kutub animalisnya. Telur dikatakan tidak terbuahi apabila pada saat evaluasi tidak dijumpai adanya kuncup fertilisasi maupun blastomer (Wijayanti *et al.*, 1998). Pada setiap ulangan diambil 50 telur kemudian dihitung jumlah telur yang terbuahi maupun yang tidak terbuahi. Keberhasilan pembuahan (FR) dinyatakan dalam persen dan dihitung dengan rumus:

$$FR = \frac{\Sigma \text{ telur terbuahi}}{\Sigma \text{ telur yang dibuahkan}} \times 100\%$$

Mengingat bahwa tujuan akhir penyimpanan sperma adalah untuk mendapatkan sperma yang masih mampu membuahi sehingga menghasilkan larva yang viabel, maka dalam penelitian ini

dihitung pula viabilitas embrio dan persentase penetasan. Pengamatan terhadap viabilitas embrio dilakukan pada tahap blastula, gastrula dan pembentukan mata. Dalam penghitungan viabilitas embrio, diambil 50 embrio dari setiap ulangan kemudian dihitung jumlah embrio yang hidup dan embrio yang mati. Viabilitas embrio (Ve) dinyatakan dalam persen dan dihitung menggunakan rumus:

$$Ve = \frac{\sum \text{embrio hidup}}{\sum \text{total embrio yang diamati}} \times 100\%$$

Persentase penetasan (HR) dihitung menggunakan rumus:

$$HR = \frac{\sum \text{larva normal}}{\sum \text{larva normal} + \text{larva cacat}} \times 100\%$$

Analisis statistik

Pengaruh faktor pengenceran dan lama penyimpanan terhadap motilitas, progresivitas dan fertilitas spermatozoa dianalisis ragam dua arah dengan pola faktorial pada tingkat signifikansi $P < 0,05$.

Hasil dan Pembahasan

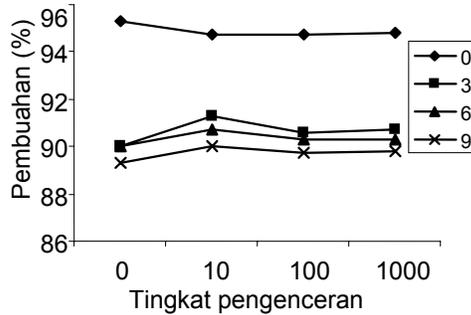
Pengamatan terhadap penampakan fisik milt menunjukkan bahwa setelah penyimpanan milt masih memiliki konsistensi yang baik dan tidak mengalami perubahan warna maupun bau. Sebelum diaktivasi sperma pada semua kelompok perlakuan bersifat immotil. Akan tetapi setelah dilakukan aktivasi dengan penambahan air sebanyak 1:1 (v:v), sperma menunjukkan persentase motilitas dengan tingkat progresivitas yang bervariasi (Tabel 1). Hasil analisis varians menunjukkan bahwa tingkat pengenceran tidak

berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap persentase motilitas sperma sedangkan lama penyimpanan secara sangat signifikan ($p < 0,01$) menurunkan persentase motilitas sperma. Terdapat interaksi yang signifikan ($p < 0,05$) antara tingkat pengenceran dan lama penyimpanan sperma terhadap persentase motilitas sperma. Tingkat pengenceran tidak berpengaruh terhadap persentase motilitas sperma dari milt segar tetapi menurunkan persentase motilitas sperma dari milt yang disimpan selama 3 hingga 9 hari. Sementara itu pengenceran milt dengan larutan Ringer dapat mempertahankan progresivitas dan lama motilitas sperma dari milt yang disimpan 3, 6, dan 9 hari. Progresivitas dan lama motilitas sperma nilen (setelah aktivasi) dari milt yang diencerkan dalam larutan Ringer hingga 1:1000 dan disimpan dalam refrigerator relatif lebih tinggi dibandingkan dengan sperma dari milt yang tidak diencerkan ($p < 0,05$). Penambahan larutan Ringer pada milt yang disimpan diduga mempertahankan aras energi serta memelihara keseimbangan tekanan osmotik lingkungan sperma sehingga motilitas dan progresivitasnya dapat dipertahankan (Cosson *et al.*, 1999). Disamping itu larutan Ringer menunda terbentuknya koagulan pada milt. Koagulan pada milt nilen terbentuk dalam dua menit pertama setelah milt kontak dengan air (Wijayanti *et al.*, 1997). Terbentuknya koagulan tersebut meningkatkan velositas milt sehingga memperpendek motilitas dan mengurangi progresivitas sperma (Mochida, *et al.*, 1999).

Tabel 1. Motilitas, progresivitas dan lama motilitas sperma nilen dari milt yang disimpan dalam refrigerator (4°C) dengan atau tanpa larutan Ringer

Tingkat pengenceran sperma	Motilitas sperma (%) \pm SD				Progresivitas				Lama motilitas sperma (detik)			
	0	3	6	9	0	3	6	9	0	3	6	9
0	85,0 \pm 0	71,0 \pm 3	68,0 \pm 4	62,3 \pm 6,3	5	1	1	1	120	20	20	20
1:10	84,7 \pm 2,3	73,0 \pm 3	69,7 \pm 2,3	69,3 \pm 1,3	5	3	3	1	120	60	60	50
1:100	83,7 \pm 4,3	71,3 \pm 2,3	71,0 \pm 1,0	69,0 \pm 3	5	4	2	2	120	120	60	50
1:1000	84,0 \pm 2,3	71,7 \pm 1,3	69,7 \pm 4,3	67,0 \pm 4	5	3	2	2	120	60	50	40

Hasil pembuahan menunjukkan bahwa sperma dari masing-masing kelompok kontrol dan kelompok uji memiliki fertilitas yang tinggi yaitu di atas 80% (Gambar 1).



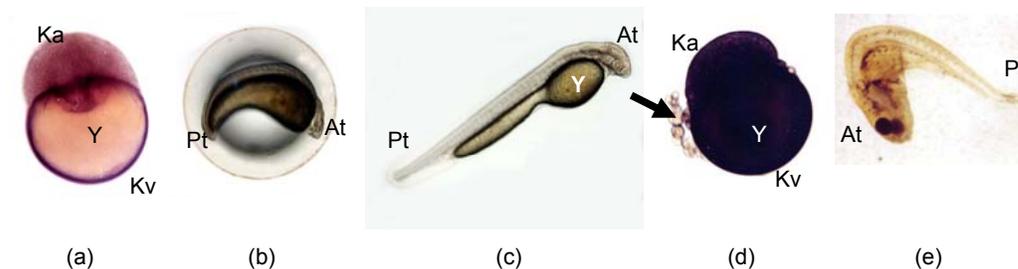
Gambar 1. Persentase pembuahan telur nilam segar oleh sperma dari milt yang telah disimpan dalam refrigerator hingga 9 hari dengan atau tanpa larutan Ringer

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa tingkat pengenceran milt tidak berpengaruh terhadap fertilitas sperma ($p > 0,05$) sedangkan lama penyimpanan secara signifikan menurunkan fertilitas sperma ($p < 0,01$), yang diindikasikan oleh penurunan persentase pembuahan. Tidak tampak adanya interaksi pengaruh ($p > 0,05$) antara tingkat pengenceran dan lama penyimpanan milt. Meskipun secara signifikan sperma dari milt yang telah

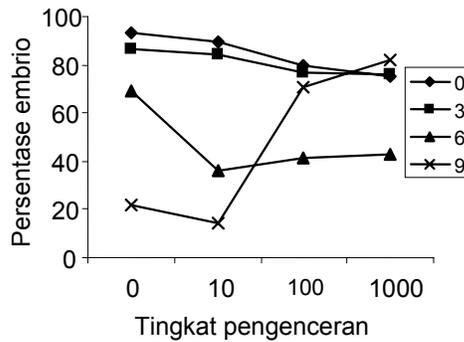
disimpan lebih rendah dari kelompok kontrol ($p < 0,01$), namun tidak dijumpai adanya pengaruh yang signifikan diantara milt yang disimpan selama 3, 6 maupun 9 hari.

Kenyataan ini mengindikasikan bahwa dengan tingkat progresivitas 1-3 dan lama motilitas 10 detik -2 menit cukup memberi peluang untuk terjadinya kontak antara sperma dan telur yang dilanjutkan dengan aktivasi telur dan membentuk embrio. Meskipun demikian embrio yang telah terbentuk tidak seluruhnya dapat mencapai tahap penetasan (Gambar 2).

Pengamatan terhadap viabilitas embrio pada stadium blastula mengindikasikan adanya mortalitas embrio yang meningkat sejalan dengan lama penyimpanan sperma (Gambar 3). Hasil analisis varians menunjukkan bahwa tingkat pengenceran ($p < 0,01$), lama penyimpanan milt ($p < 0,01$) dan interaksi keduanya ($p < 0,01$) secara signifikan berpengaruh terhadap perkembangan dan kelangsungan hidup embrio. Hal yang menarik di sini adalah bahwa pola interaksi berubah menurut lama waktu penyimpanan milt (Gambar 3). Perlu diteliti apakah sperma yang telah disimpan masih mampu membuahi telur dan memberikan kontribusi terhadap perkembangan embrio pada tahap perkembangan selanjutnya.



Gambar 2. Morfologi embrio dan larva. (a)-(c) berturut-turut blastula, tahap pembentukan mata dan larva baru menetas hasil pembuahan antara sperma kelompok kontrol dengan telur segar. (d) tipikal blastula cacat dan (e) larva cacat hasil pembuahan antara sperma yang disimpan dengan pengenceran dengan telur segar. At. Anterior, KA. Kutub animalis, KV. Kutub vegetalis, Pt. Posterior, Y. Yolk, anak panah menunjukkan sebagian blastomer yang terlepas



Gambar 3. Viabilitas embrio hingga stadium blastula akhir yang diperoleh dari pembuahan telur segar dan sperma yang telah disimpan pada refrigerator dengan atau tanpa larutan Ringer

Pada ikan zebra, perkembangan embrio selama stadium pre-blastula masih diatur oleh maternal RNA sehingga embrio dapat berkembang meskipun tanpa kontribusi genetik dari sperma. Akan tetapi pada stadium mid-blastula transkripsi embrio mulai diaktivkan (Zamir *et al.*, 1997), untuk itu kontribusi genetik dari sperma sangat diperlukan bagi perkembangan normal embrio. Sangat beralasan untuk menduga kemungkinan adanya pola pengaturan perkembangan seperti yang terjadi pada ikan zebra tersebut juga terjadi pada perkembangan embrio nilem. Untuk memastikan dugaan ini perlu dilakukan penelitian tentang transkripsi zigotik secara diferensial serta penelitian tentang kemungkinan adanya autoaktifasi pada telur nilem.

Setelah tahap gastrula mortalitas embrio meningkat terutama pada kelompok uji. Pada tahap penetasan lebih dari 83% embrio dari kelompok kontrol menetas dengan baik, pada milt yang disimpan selama 3 hari hanya sekitar 60% embrio yang menetas sedangkan dari milt yang disimpan selama 6 dan 9 hari hampir tidak ada yang menetas (Tabel 2).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa lama penyimpanan milt secara signifikan ($p < 0,01$) menurunkan persentase penetasan embrio sedangkan tingkat pengenceran milt ($p > 0,05$) dan interaksinya ($p > 0,05$) tidak memperlihatkan pengaruh yang signifikan. Dengan memperhatikan nilai HR sebagai indikator keberhasilan penyimpanan sperma, maka dapat dikatakan bahwa viabilitas sperma nilem yang diencerkan dalam larutan Ringer dan disimpan dalam refrigerator hanya dapat dipertahankan hingga 3 hari.

Dalam penelitian ini viabilitas sperma dapat dipertahankan lebih lama dibanding penelitian sebelumnya dengan penyimpan sperma pada suhu ruang yang hanya dapat dipertahankan selama 3 jam (Wijayanti *et al.*, 1997; Martini, 1998). Perbedaan tersebut salah satunya disebabkan oleh perbedaan suhu penyimpanan. Suhu mendekati 0°C lebih mampu mempertahankan viabilitas sperma dibandingkan dengan suhu ruang (Jeziarska & Witeska, 1999). Faktor lain yang berpengaruh terhadap viabilitas sperma adalah ketersediaan oksigen. Hasil penelitian DiLauro *et al.* (1994) menunjukkan bahwa viabilitas sperma *Acipenser oxyrinchus* dan *A. brevirostrum* yang disimpan dalam refrigerator dapat dipertahankan hingga 5-7 hari dengan penambahan oksigen setiap hari. Ada kemungkinan viabilitas sperma nilem masih dapat dipertahankan lebih lama dengan penambahan oksigen selama penyimpanan. Oksigen diperlukan untuk sintesis ATP yang dibutuhkan dalam mempertahankan motilitas sperma (Kopeika *et al.*, 1997). Dengan adanya penyempurnaan cara penyimpanan diharapkan metode ini dapat membantu petani untuk menyelamatkan induk-induk nilem yang gagal memijah sebagai akibat dari kondisi lingkungan yang kurang mendukung.

Tabel 2. Persentase penetasan embrio nilem hasil pembuahan telur segar dengan sperma yang telah disimpan dalam refrigerator selama 3-9 hari dengan atau tanpa larutan Ringer

Pengenceran sperma	Lama penyimpanan milt (hari)			
	0	3	6	9
Tanpa larutan Ringer	98,3 ± 0,3	60,7 ± 1,3	0,67 ± 0,3	0
1:10	98 ± 0	60,7 ± 0,3	1 ± 0	0
1:100	98,3 ± 0,3	59,67 ± 0,3	1 ± 1	0
1: 1000	98,2 ± 0,3	56,3 ± 0,3	0,67 ± 0,3	0

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada suhu penyimpanan 4°C, viabilitas sperma ikan nilem yang tidak diencerkan maupun yang diencerkan 1:10 (v/v) dengan larutan Ringer dapat dipertahankan selama 3 hari.

Penelitian lanjutan masih perlu dilakukan untuk menyempurnakan metode penyimpanan sperma, khususnya ikan nilem. Perbaikan yang perlu dilakukan antara lain pertama, dilakukan pemisahan sperma dari seminal plasma untuk menghilangkan koagulan; kedua penambahan oksigen selama penyimpanan untuk memperpanjang lama motilitas sperma.

Daftar Pustaka

- Alvi, S.M.H., J. Cosson, M. Karami, B.M. Amiri, and M.A. Akhoundzadeh. 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effect of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction*. 128: 819-828.
- Billard, R. 1978. Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*. 14: 187-198.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction, Nature and Development*. 2: 877-920.
- Billard, R. and M.P. Cosson. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in

freshwater fish. *J. Experimental Zoology*. 261: 122-131.

- Billard, R., J. Cosson, S.B. Noveiri, and M. Pourkazemi. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*. 236: 1-9.
- Cosson, J., R. Billard, C. Cibert, C. Dreanno, and M. Suquet. 1999. Ionic factor regulating the motility of fish sperm. *In: The male gamete: from basic science to clinical applications*. C. Gagnon (Ed). Cache River Press. Vienna. 162-186.
- DiLauro, M.N., W.F. Krise, M.A. Hendrix, and S.E. Baker. 1994. Short-term cold storage of atlantic sturgeon sperm. *Progressive Fish-Culturist*. 56: 143-144.
- Ingermann, R.L., M. Holcomb, M.L. Robinson, and J.G. Cloud. 2002. Carbondioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *J. Experimental Zoology*. 205: 2885-2890.
- Jeziarska B. and M. Witeska. 1999. The effect of time and temperature on motility of spermatozoa of common and grass carp. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*, 2(2). <http://ejpau.media.pl/sries/volume2/issue2/fisheries/art-04.html>. Diakses tanggal 14 Juni 2005.

- Kavamoto, E.T., W. Fogli da Silva, M.G. Regolino, Y.A. Tabata, and B.E.S. Campos. 2001. Producao espermatica e teste de fertilizacao do semen de truta arco-iris, *Salmo irideus* Gibbons no primeiro ciclo reprodutivo. B. Inst Pesca. 14: 51-62.
- Kopeika, F.F., S.I. Drokin, V.V. Cherepanov, B.B. Dzuba, and L.L. Tsvetkova. 1997. Oxygen and fish spermatozoa cryoresistance. 66Cryo'97. 34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology 66. Barcelona, June 1997. Abstract.
- Marques S. and H.P. Godinho. 2004. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47(4): 799-804.
- Martini, R. 1998. Viabilitas spermatozoa ikan nilem (*Osteochilus hasselti* C.V.) setelah diejakulasikan. Skripsi. Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto. 60 p.
- McNiven, M.A., R.K. Gallant, and G.F. Richardson. 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. Aquaculture. 109: 71-82.
- Mochida, K., T. Kondo, T. Matsubara, S. Adachi, and K. Yamauchi. 1999. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Development Growth and Differentiation 41: 619-627.
- Park, C. and F.A. Chapman. 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North American Journal of Aquaculture. 67: 52-57.
- Sensusinawati, S.W. 1983. Pengaruh lama penyimpanan sperma ikan mas terhadap keberhasilan pembuahan dan penetasan telur. Karya Ilmiah. Fakultas Perikanan IPB, Bogor. 65 p.
- Stoss, J. 1983. Fish gamet preservation and spermatozoon physiology. In: Fish Physiology IXB. W.S. Hoar, D.J. Randall, E.M. Doaldson (Eds.). Academic Press New York. 305-350.
- Wijayanti, G.E., Soeminto, S.B.I. Simanjuntak, P. Susatyo, dan A.E. Pulungsari. 1995. Studi pendahuluan untuk peningkatan mutu benih ikan nilem (*Osteochilus hasselti* C.V.) melalui induksi dan penetasan dalam akuarium. Laporan Penelitian. Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto. 43 p.
- Wijayanti, G.E., Sugiharto, S.B.I. Simanjuntak, P. Susatyo, dan E.T. Winarni. 1997. Fertilitas telur dan sperma ikan nilem (*Osteochilus hasselti* C.V.) pasca stripping dalam media alami. Laporan Penelitian. Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto. 41 p.
- Wijayanti, G.E., Sugiharto, P. Susatyo, dan A. Nuryanto. 1998. Perkembangan embrio dan larva ikan nilem yang diinkubasi pada media dengan berbagai temperatur. Laporan Penelitian. Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto. 40 p.
- Zamir, E., Z. Kam, and A. Yarden. 1997. Transcription-dependent induction of G1 phase during the zebra fish midblastula transition. Molecular and Cellular Biology. 17(2): 529-536.