

PENGARUH RASIO PENGECERAN BERBEDA TERHADAP KUALITAS SPERMA IKAN NILEM (*Osteochillus hasselti*) YANG DISIMPAN DALAM EKSTENDER SARI KURMA, SUSU DAN KUNING TELUR

Laela Fitri¹, Dewi Wisudyati Budi Hastuti^{1*}, Marhaendro Santoso¹, Anandita Ekasanti¹, Emyliana Listiowati¹, Dewi Nugrayani¹

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan , Universitas Jenderal Soedirman

*Email : dewiwiz@gmail.com

ABSTRACT

*The purpose of this research was to determine the quality of spermatozoa of Nilem Fish (*Osteochillus hasselti*) after storage in extender palm juice, milk and egg yolk with different dilution ratios. The treatment given was in the form of different dilution ratios between sperm and extender palm juice, milk and egg yolk, namely P1: dilution ratio 1:10, P2: dilution ratio 1:15 and P3: dilution ratio 1:20. The data obtained were analyzed by means of variance (ANOVA). Data that showed a significant effect were continued with further Duncan testing. The results showed that the treatment had a significant effect on motility and viability, but did not have a significant effect on fertility and hatchability.*

Keywords: *Dilution ratio, *Osteochilus hasselti*, Sperm quality, Storage*

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas spermatozoa Ikan Nilem (*Osteochillus hasselti*) pasca penyimpanan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran yang berbeda. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang diberikan berupa rasio pengenceran yang berbeda antara sperma dengan ekstender sari kurma, susu dan kuning telur yaitu P1: rasio pengenceran 1:10, P2: rasio pengenceran 1:15 dan P3: rasio pengenceran 1:20. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA). Data yang menunjukkan adanya pengaruh nyata dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan memberi pengaruh nyata terhadap motilitas dan viabilitas, tetapi tidak memberi pengaruh yang nyata terhadap fertilitas dan daya tetas.

Kata kunci : Kualitas sperma, Penyimpanan, *Osteochilus hasselti*, Rasio pengenceran

PENDAHULUAN

Ikan nilem (*Osteochilus hasselti*) merupakan ikan lokal asli Indonesia. Ikan nilem termasuk famili Cyprinidae dengan keragaman spesies endemik di Indonesia yang cukup tinggi (Sunarna *et al.*, 2010). Ikan nilem berperan sebagai *biocleaning*

agent karena sifatnya yang suka memakan detritus dan perifiton. Ikan nilam juga mudah dipelihara pada kondisi air yang berbeda-beda, memiliki sintasan dan reproduksi yang tinggi serta tahan terhadap penyakit (Mulyasari *et al.*, 2010).

Budidaya ikan nilam dapat dilakukan secara alami maupun buatan. Kesulitan yang sering dihadapi dalam pemijahan buatan adalah ketersediaan sperma yang cukup pada waktu kegiatan pembuahan (Setyono, 2009). Salah satu upaya yang dilakukan untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan melakukan penyimpanan sperma. Penyimpanan sperma merupakan suatu metode yang dapat digunakan pada saat induk ikan jantan matang gonad, sehingga sperma dari jantan unggulan dapat disimpan dan dipergunakan sesuai kebutuhan tanpa harus menunggu ikan matang gonad kembali (Linayati *et al.*, 2015). Menurut Faqih (2011), kualitas sperma dikatakan bagus apabila tingkat motilitas mencapai 60%.

Penyimpanan sperma bertujuan untuk mengoptimalkan jangka waktu penggunaan spermatozoa yang unggul untuk membuahi sel telur yang sejenis secara buatan. Proses penyimpanan sperma memerlukan bahan pengencer yang dapat mengurangi aktifitas spermatozoa sehingga menghambat pemakaian energi dan dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa (Rahardhianto *et al.*, 2012). Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penyimpanan sperma antara lain suhu, lama penyimpanan, media pengenceran dan rasio pengencerannya (Linayati *et al.*, 2015). Rasio pengenceran adalah perbandingan antara volume bahan yang diencerkan dengan volume pelarut. Penentuan rasio pengenceran yang tepat akan berpengaruh terhadap daya gerak spermatozoa. Menurut Adipu *et al.*, (2011) Konsentrasi sperma yang tinggi dapat menghambat aktivitas spermatozoa, karena daya geraknya akan berkurang sehingga spermatozoa akan sulit menemukan atau menembus mikrofil pada sel telur yang menyebabkan rendahnya fertilisasi.

Media penyimpanan harus mampu memberikan sifat penyangga (*buffer*) dan dapat melindungi sperma terhadap *cold shock* agar keadaan sperma tetap stabil (Fariedah & Widodo, 2020). Selain itu, dalam bahan pengencer dibutuhkan nutrisi untuk energi sperma yang berupa fruktosa atau glukosa. Penambahan fruktosa atau glukosa untuk mendukung proses pembentukan Adenosine Triphosphate (ATP) dan Adenosine Diphosphate (ADP) yang harus berlangsung. Sari kurma, susu dan kuning telur merupakan kombinasi bahan yang dapat digunakan sebagai ekstender pada penyimpanan sperma.

Buah kurma mengandung komponen yang sebagian besar merupakan gula pereduksi, yaitu glukosa dan fruktosa 20-70% (bobot kering) sehingga dapat digunakan sebagai sumber energi pada sperma untuk tetap bertahan hidup pada larutan pengencer (Fariedah & Widodo, 2020). Susu skim mengandung protein, glukosa, air dan lemak yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Susu skim juga mengandung zat lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer semen untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh kejut dingin (*cold shock*) (Hoesni, 2016). Kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang dapat digunakan sebagai bahan penyangga (*buffer*) semen dan mencegah terjadinya *cold shock* akibat penurunan temperatur yang mendadak. Kuning telur juga mengandung glukosa yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Suteky *et al.*, 2008).

Pada penelitian Sarder *et al.*, (2009) kombinasi ekstender urea dan kuning telur dengan krioprotektan glyserol menggunakan rasio pengenceran 1:4 menunjukkan persentase motilitas sebesar 79% pada ikan mas mrigal. Menurut Novianto *et al.*, (2014) penggunaan konsentrasi gliserol yang dikombinasikan dengan pengencer susu skim dan kuning telur tidak memberikan perbedaan yang nyata terhadap persentase motilitas dan

viabilitas spermatozoa ikan patin. Penggunaan air kelapa dan gliserol dengan rasio pengenceran berbeda menunjukkan rasio terbaik untuk motilitas adalah 1:10 dan untuk viabilitas 1:15. Hasil penelitian tersebut tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap fertilitas dan daya tetas telur ikan nilem (Shofania, 2020). Penelitian mengenai penggunaan susu dan kuning telur yang dikombinasikan dengan sari kurma perlu dilakukan, salah satunya pada ikan nilem. Ikan nilem digunakan sebagai contoh penerapan teknologi untuk ikan dengan jenis yang sama. Penelitian ini untuk menguji apakah kombinasi ekstender tersebut efektif digunakan pada ikan Cyprinidae dengan perlakuan rasio pengenceran yang berbeda.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dan 5 ulangan. Larutan ekstender yang digunakan adalah susu cair *low fat*, kuning telur ayam dan sari kurma. Perlakuan yang diberikan yaitu :

P1 = Rasio pengenceran 1:10 (0,1 ml sperma + 1 ml ekstender)

P2 = Rasio pengenceran 1:15 (0,1 ml sperma + 1,5 ml ekstender)

P3 = Rasio pengenceran 1:20 (0,1 ml sperma + 2 ml ekstender)

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sperma dan telur ikan nilem (*Osteochilus hasselti*). Induk jantan yang digunakan berukuran 95,25 gram dan induk betina berukuran 117,45 gram yang diperoleh dari pembudidaya di daerah Pabuaran, Purwokerto Utara. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas sperma yang meliputi pergerakan sperma (motilitas), waktu hidup sperma (viabilitas), fertilitas dan daya tetas telur ikan nilem. Pelaksanaan penelitian ini meliputi persiapan objek, alat dan bahan, pembuatan ekstender, preparasi sperma, penyimpanan sperma, pembuahan, pengamatan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa serta fertilitas dan daya tetas telur.

Persiapan objek, alat dan bahan

Persiapan objek dengan menyiapkan induk ikan nilem yang berasal dari Purwokerto serta menyiapkan bahan dan alat di meja laboratorium.

Pembuatan Ekstender

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstender yaitu susu 84%, kuning telur 5% dan sari kurma 11%. Pembuatan ekstender sebanyak 30 mL dilakukan dengan cara mencampurkan susu 25,2 mL, kuning telur 1,5 mL dan sari kurma 3,3 mL kedalam botol vial kemudian dihomogenkan.

Preparasi Sperma

Induk ikan nilem jantan yang siap memijah dipingsankan terlebih dahulu sebelum di *stripping*. Sperma segar yang dihasilkan kemudian ditampung ke dalam botol vial. Sperma tersebut disimpan dalam kotak styrofoam yang sudah berisi cacahan es batu. Sperma segar diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi volume dan pH sperma. Sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi persentase motilitas dan viabilitas sperma.

Penyimpanan Sperma

Pengenceran sperma dilakukan dengan perbandingan sperma dan ekstender yaitu 1:10, 1:15 dan 1:20. Sperma yang telah dikumpulkan kemudian diambil sebanyak 0,1 mL untuk setiap ulangan dan dicampurkan dengan ekstender sesuai dengan perlakuan masing-masing. Sperma yang telah homogen dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1 mL dan disimpan ke dalam freezer selama 7 hari.

Pembuahan

Induk ikan nilam betina yang siap mijah diambil telurnya. Pembuahan dilakukan dengan mencampurkan telur sekitar 100 butir dengan sperma segar dan sperma yang telah disimpan. Telur-telur tersebut kemudian disimpan ke dalam mangkok yang sudah diisi air dan dipasang aerasi.

Pengamatan Persentase Motilitas, Viabilitas, Fertilitas dan Daya Tetas

Pengamatan motilitas sperma dilakukan dengan mencatat persentase pergerakan sperma. Pengamatan viabilitas dilakukan dengan mencatat waktu pergerakan sperma dari bergerak sampai tidak bergerak (mati) menggunakan stopwatch. Pengukuran persentase fertilitas dilakukan dengan menghitung jumlah telur yang dibuahi dibagi dengan jumlah telur sampel dikalikan seratus. Pengukuran persentase daya tetas telur dilakukan dengan menghitung jumlah telur yang menetas dibagi dengan jumlah total telur yang dibuahi dikalikan seratus.

Analisis Data

Data yang diperoleh adalah motilitas dan viabilitas sperma ikan nilam, serta fertilitas dan daya tetas telur ikan nilam. Data motilitas, viabilitas, fertilitas dan daya tetas dianalisis secara statistika dengan ANOVA. Apabila terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian kualitas sperma Ikan Nilam (*Osteochillus hasselti*) yang disimpan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran yang berbeda meliputi motilitas, viabilitas, fertilitas dan daya tetas dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas Sperma Ikan Nilam Pasca Penyimpanan dalam Ekstender Sari Kurma, Susu dan Kuning Telur dengan Rasio Pengenceran Berbeda Selama 7 Hari (Rataan \pm SD).

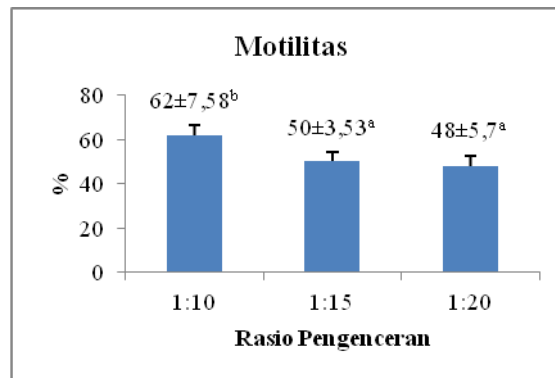
Parameter	Pasca Penyimpanan		
	P1	P2	P3
Motilitas (%)	62 \pm 7,58 ^b	50 \pm 3,53 ^a	48 \pm 5,7 ^a
Viabilitas (Detik)	18,14 \pm 0,65 ^b	11,95 \pm 1,56 ^a	10,41 \pm 2,19 ^a
Fertilitas (%)	7,6 \pm 9,55 ^a	1 \pm 2,23 ^a	0,6 \pm 1,34 ^a
Daya Tetas (%)	8,6 \pm 19,23 ^a	0 \pm 0 ^a	0 \pm 0 ^a

Keterangan : P1: rasio pengenceran 1:10, P2: rasio pengenceran 1:15, P3: rasio pengenceran 1:20. Huruf *superscript* yang berbeda di belakang angka pada garis yang

sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada kualitas sperma ikan nilam yang disimpan pada ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda.

Motilitas

Hasil uji statistik pada pengamatan motilitas sperma menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$) dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.

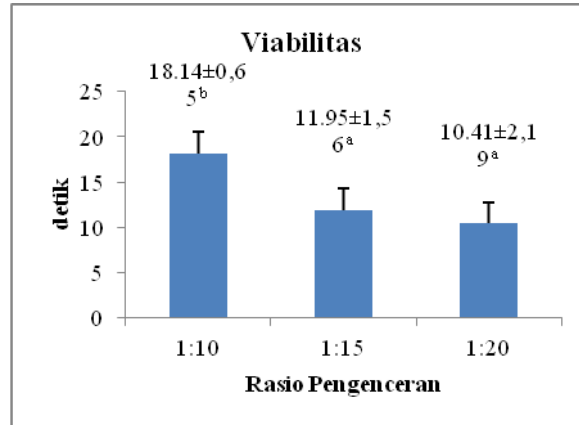


Gambar 1. Grafik motilitas sperma Ikan Nilam pasca penyimpanan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda selama 7 hari (Rataan \pm SD).

Berdasarkan gambar 1, dapat dilihat rata-rata nilai motilitas sperma ikan nilam pasca penyimpanan antara 48%-62%. Hasil uji lanjut menunjukkan P1 berbeda dengan P2 dan P3, sedangkan P2 tidak berbeda dengan P3. Persentase motilitas pada P1 dengan rasio pengenceran 1:10 sebesar 62%. Tingginya nilai motilitas spermatozoa pada P1 diduga karena campuran ekstender dengan rasio 1:10 memberikan nutrisi yang cukup untuk sperma bergerak. Rendahnya nilai motilitas pada P3 diduga karena derajat pengenceran yang berlebihan. Menurut Iromo *et al* (2007) derajat pengenceran yang berlebihan akan menyebabkan terjadinya regulasi ion dan air yang ada di dalam spermatozoa. Konsentrasi ion yang tinggi dalam spermatozoa akan terdifusi ke media yang konsentrasi ionnya lebih rendah dan air yang ada di media akan terdifusi ke dalam spermatozoa, sehingga menyebabkan hilangnya beberapa zat-zat dari spermatozoa dan seminal plasma yang akhirnya dapat menghambat motilitas sperma. Semakin lama spermatozoa disimpan maka cadangan makanan yang digunakan sebagai sumber energi akan semakin berkurang, selain itu berkurangnya oksigen selama masa penyimpanan juga mempengaruhi penurunan persentase motilitas spermatozoa (Danang *et al.*, 2012).

Viabilitas

Hasil uji statistik pada pengamatan viabilitas sperma menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$) dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.

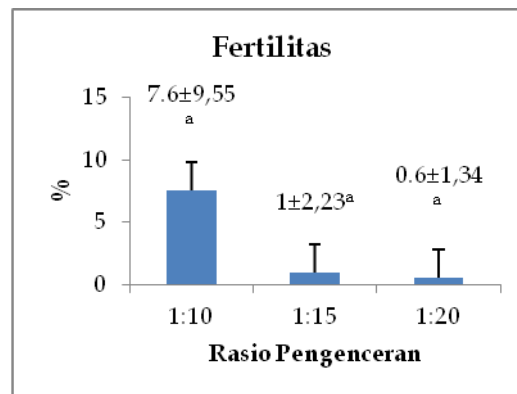


Gambar 2. Grafik viabilitas sperma Ikan Nilem pasca penyimpanan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda selama 7 hari (Rataan ± SD).

Berdasarkan Gambar 2, rata-rata nilai viabilitas spermatozoa ikan nilem pasca penyimpanan berkisar antara 10,41 detik – 18,14 detik. Hasil uji lanjut viabilitas menunjukkan P1 berbeda dengan P2 dan P3, sedangkan P2 tidak berbeda dengan P3. Nilai viabilitas terbaik pada P1 dengan rasio pengenceran 1:10 sebesar 18,14 detik. Tingginya nilai viabilitas P1 sebanding dengan persentase motilitas pada P1. Rendahnya nilai viabilitas pada P3 diduga karena terlalu banyaknya volume ekstender sehingga terdapat banyak ruang gerak yang menyebabkan sperma terus bergerak dan metabolisme meningkat. Peningkatan metabolisme tersebut menyebabkan spermatozoa cepat kehilangan energi dan akan cepat mengalami kematian (Linayati *et al.*, 2015). Menurut Danang *et al.*, (2012), semakin berkurangnya cadangan makanan, dan ketidakseimbangan cairan elektrolit akibat metabolisme spermatozoa akan menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa. Kerusakan tersebut karena pertukaran larutan antara bahan pengencer dengan spermatozoa yang terdapat adanya perbedaan konsentrasi. Proses pengenceran semen akan menyebabkan rusaknya membran plasma serta dapat menurunkan motilitas.

Fertilitas

Hasil uji statistik pada pengamatan fertilitas telur menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P > 0,05$) dapat dilihat pada Gambar 3 berikut.

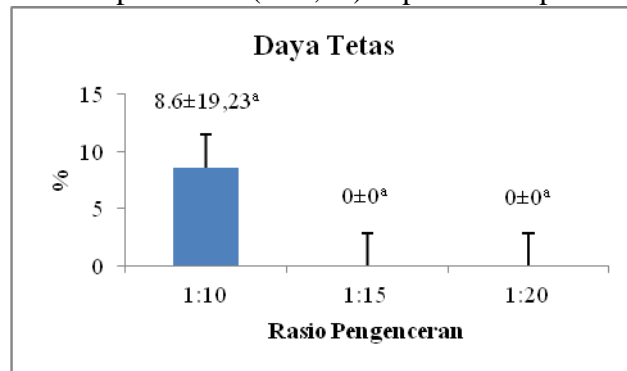


Gambar 3. Grafik fertilitas telur Ikan Nilem pasca penyimpanan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda selama 7 hari (Rataan ± SD).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan perbedaan yang nyata. Nilai fertilitas adalah P1 dengan rasio pengenceran 1:10 sebesar 7,6%. Tingkat keberhasilan fertilisasi dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa yang baik. Kualitas sperma tersebut adalah motilitas dan viabilitas, apabila persentase motilitas dan viabilitas tinggi maka persentase fertilitas akan tinggi juga (Nainggolan *et al.*, 2015). Apabila kondisi pergerakan sperma aktif dan lincah dan sangat cepat diperkirakan proses fertilisasi tertinggi akan terjadi sekitar 70%. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa memiliki kemampuan dan energi (ATP) yang sangat besar untuk menembus lubang mikrofil sel telur. Sedangkan apabila kondisi motilitas lemah maka kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikrofil cukup lemah, pembuahan akan terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat (Adipu *et al.*, 2011).

Daya Tetas

Hasil uji statistik pada pengamatan daya tetas telur menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P>0,05$) dapat dilihat pada Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Daya Tetas Telur Ikan Nilem pasca penyimpanan dalam ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda selama 7 hari (Rataan ± SD).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak memberikan perbedaan yang nyata. Nilai daya tetas adalah P1 dengan rasio pengenceran 1:10 sebesar 8,6%, sedangkan pada P2 dan P3 tidak terjadi adanya pembuahan. Persentase daya tetas telur ikan sangat di pengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal yang mempengaruhi daya tetas yaitu perkembangan embrio yang terhambat karena kualitas spermatozoa yang kurang motil serta telur yang kurang baik. Sedangkan faktor eksternal yaitu lingkungan seperti temperatur, air, oksigen, pH dan amoniak (Duwente *et al.*, 2016). Menurut Rachimi *et al.*, (2016) apabila persentase fertilitas tinggi maka akan diikuti oleh persentase daya tetas yang tinggi juga, sedangkan jika persentase fertilitas rendah maka persentase daya tetas akan rendah juga.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa Ikan Nilem. Motilitas dan viabilitas terbaik pada P1 dengan rasio pengenceran 1:10.

2. Ekstender sari kurma, susu dan kuning telur dengan rasio pengenceran berbeda tidak berpengaruh terhadap fertilitas dan daya tetas telur Ikan Nilem. Fertilitas dan daya tetas terbaik pada P1 dengan rasio pengenceran 1:10.

DAFTAR PUSTAKA

- Adipu, Y., Sinjal, H. J., & Watung, J. (2011). Ratio Pengenceran Sperma Terhadap Motilitas Spermatozoa, Fertilitas Dan Daya Tetas Ikan Lele (*Clarias* sp.). *Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis*, 7(1), 48–55. <https://doi.org/10.35800/jpkt.7.1.2011.16>
- Danang, D. R., Isnaini, N., & P, T. (2012). Pengaruh lama simpan semen terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dalam pengencer ringer pada suhu 4°C. *Jurnal Ternak Tropika*, 13(1), 45–47.
- Duwente, H., Juliana, & Syamsuddin. (2016). Daya Tetas Telur dan Sintasan Larva dari Hasil Penambahan Madu pada Bahan Pengencer Sperma Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Perikanan Dan Ilmu Kelautan*, 3(2), 1–8.
- Faqih, A. R. (2011). Penurunan motilitas dan daya fertilitas sperma Ikan Lele Dumbo (*Clarias* spp) pasca perlakuan stress kejutan listrik. *The Journal of Experimental Life Science*, 1(2), 72–82.
- Fariedah, F., & Widodo, M. S. (2020). Kombinasi Ekstender Larutan Sari Kurma (*Phoenix dactylifera*) dan Ringer Laktat dalam Kualitas Spermatozoa Beberapa Ikan Air Tawar. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 9(3), 182–188.
- Hoesni, F. (2016). Efek Penggunaan Susu Skim Dengan Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*, 16(3), 46–56.
- Iromo, H., Supriatna, I., & Riani, E. (2007). Efektifitas Pengencer Laktat Ringer, Modifikasi Ringer dan Larutan Fisiologis NaCl Terhadap Viabilitas Preservasi Spermatozoa Ikan Baung (*Mystus nemurus*). *Acuaqultura Indonesia*, 8(1), 49–57.
- Linayati, Basuki, F., & Pinandoyo. (2015). Efektivitas Penambahan Glycerol Dalam Susu Pengencer Terhadap Prosentase Sperma Hidup Dan Penetasan Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* Linn). *PENA Akuatika*, 12(1), 43–57.
- Mulyasari, M., Soelistyowati, D. T., Kristanto, A. H., & Kusmini, I. I. (2010). Karakteristik Genetik Enam Populasi Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*) DI Jawa Barat. *Jurnal Riset Akuakultur*, 5(2), 175–182. <https://doi.org/10.15578/jra.5.2.2010.175-182>
- Nainggolan, R., Monijung, Revol, D., & Mingkid, W. (2015). Penambahan Madu Dalam Pengenceran Sperma Untuk Motilitas Spermatozoa, Fertilisasi dan Daya Tetas Telur Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Budidaya Perairan*, 3(1), 131–140.
- 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.
- Rachimi, E. I., Raharjo, & Syaidi, M. (2016). Rasio Penambahan Madu Dalam NaCl Untuk Pengenceran Sperma Terhadap Fertilisasi dan Daya Tetas Telur Ikan. *Jurnal Ruaya*, 4(1), 39–44.

- 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.
- Sarder, M. R. I., Rafiquzzaman, S. M., Sultana, I. R., & Faridul, M. I. (2009). Cryopreservation Of Spermatozoa of Mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* With a 39 View to Minimize Inbreeding and Hybridization. *J. Bangladesh Agril*, 7(1), 211–218.
- Setyono, B. (2009). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Bahan Pada Pengencer Sperma Ikan Skim Kuning Telur Terhadap Laju Fertilisasi , Laju Penetasan dan Sintasan Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Gamma*, 5(1), 1–12.
- Shofania, S. N. (2020). *Kualitas Sperma Ikan Nilem (Osteochilus Sp.) Yang Disimpan Pada Ekstender Air Kelapa Dan Gliserol Dengan Rasio Pengenceran Berbeda*. Skripsi. Universitas Jenderal Soedirman.
- Sunarma A, D. W. B. dan Y. sistina. (2010). Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow,. *Omni Akuatika*, 9(11), 51–55.
- Suteky, T., Kadarsih, S., & Novitasari, Y. Y. (2008). Pengaruh Pengencer Susu Skim dengan Sitrat Kuning Telur dan Lama Penyimpanan terhadap Kualitas Semen Kambing Persilangan Nubian dengan Peranakan Ettawa. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 3(2), 81–88. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.3.2.81-88>