

PEMANFAATAN MADU SEBAGAI BAHAN EKSTENDER UNTUK KRIOPRESERVASI SPERMA IKAN GABUS (*Channa striata*)

*The utilization of honey as extender for stripped snakehead (*Channa striata*) sperm cryopreservation*

Anugerah Al Amin Mangkunegara¹, Sefti Heza Dwinanti^{1*}, Mochamad Syaifudin¹

¹Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya
Jl. Raya Palembang Prabumulih KM 32 Ogan Ilir Telp. 0711 7728874

*Korespondensi email : sefti.heza@unsri.ac.id

ABSTRACT

Cryopreservation of channa is needed to improve reproduction quality of seeds and broodstock. Some components are important for cryopreservation including quality and quantity of extender. The aim of this study was to investigate the influence honey as extender at different ratio on channa sperm cryopreservation quality. The research used response surface methodology (RSM) with three treatments (T); 300 mg. ml⁻¹ (T1), 400 mg. ml⁻¹ (T2), 500 mg. ml⁻¹ (T3), which all treatments were replicated 3 times. The processed semen was equilibrated at 5°C for 3 h (chilling), packed into straws (0.25 ml), frozen and stored in a liquid nitrogen tank for 24 h before thawing and assessment of quality. Parameters observed were sperm characteristics such as sperm color, pH, concentration and sperm volume, motility and viability before and after cryopreservation. The results of this study indicated the best treatment was honey concentration at 400 mg.ml⁻¹ (T2). After 7 days preservation, the motility value was about 40 – 70 %, viability percentage was 64.15% and no abnormality was occurred on channa sperm.

Keywords: Channa sperm, extender, cryopreservation, honey

ABSTRAK

Kriopreservasi pada ikan gabus dibutuhkan untuk pengembangan kualitas reproduksi benih dan induk ikan gabus. Komponen penting yang menentukan keberhasilan kriopreservasi adalah kualitas dan kuantitas ekstender. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh madu sebagai ekstender pada rasio yang berbeda, untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas sperma ikan gabus. Penelitian ini menggunakan *response surface methodology* (RSM), menggunakan 3 perlakuan (P); 300 mg. ml⁻¹ (P1), 400 mg. ml⁻¹ (P2), 500 mg. ml⁻¹ (P3) dengan pengulangan 3 kali. Semen yang tersedia diequilibrasi pada suhu 5°C selama 3h, selanjutnya dimasukkan ke dalam *straws* (0,25 ml), dibekukan dan disimpan dalam kontainer selama 24 jam sebelum pencairan dan pengamatan kualitas semen. Parameter yang diamati meliputi karakteristik sperma seperti warna, pH, konsentrasi dan volume sperma, motilitas dan viabilitas sebelum dan sesudah kriopreservasi. Hasil dari penelitian menunjukkan konsentrasi 400 mg.ml⁻¹ madu (P2) merupakan dosis terbaik dari madu sebagai ekstender untuk kriopreservasi sperma selama 7 hari penyimpanan. Nilai motilitas berkisar antara 40 – 70%, persentase viabilitas 64,15 % dan tidak terdapat abnormalitas yang terjadi pada sperma ikan gabus.

Kata Kunci : Ekstender, kriopreservasi, madu dan sperma ikan gabus

PENDAHULUAN

Ikan gabus (*Channa striata*) merupakan salah satu komoditas air tawar yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan dimanfaatkan tidak hanya memenuhi kebutuhan protein hewani akan tetapi digunakan juga pada kegiatan farmasi (Hossain *et al.*, 2008). Oleh karena itu, produksi ikan gabus secara kontinu sangat diharapkan untuk mendukung kedua sektor tersebut. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah mengontrol reproduksi ikan baik dengan mensinkronkan ketersediaan gamet jantan dan betina ataupun memanfaatkan sperma yang tersedia secara efisien sehingga produksi benih dapat dilakukan sepanjang tahun.

Kriopreservasi merupakan metode penyimpanan sperma dalam keadaan beku dimana terjadi reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada. Suhu penyimpanan sperma yang digunakan umumnya -196°C dalam nitrogen cair (Boediono, 2003). Keberhasilan kriopreservasi sperma ditentukan oleh beberapa faktor antara lain bahan

ekstender, bahan krioprotektan, rasio pengenceran (dilution ratio), laju pembekuan dan pencairan kembali (*freezing and thawing rate*) (Billard, *et al.*, 1995).

Krioprotektan adalah bahan pelindung sel sperma dari kejutan suhu dingin dan panas sehingga mampu mencegah dehidrasi pada sel (Chao, 1991). Beberapa bahan yang baik digunakan untuk krioprotektan seperti dimetil sulfoksida (DMSO), gliserol, metanol, etilen glikol (EG) dan dimetil asetat (DMA) (Glogowski *et al.*, 2002; Billard *et al.*, 2004; Urbanyi *et al.*, 2004; Horvath *et al.*, 2005; Linhart *et al.*, 2009; Kopeika *et al.*, 2007., *dalam* Yamaner *et al.*, 2015). Gliserol merupakan krioprotektan yang lebih efektif di gunakan untuk kriopreservasi ikan gabus (Sumathi 2004).

Ekstender adalah media pengencer sperma yang berperan penting dalam kriopreservasi berfungsi untuk menginduksi motilitas awal dan meningkatkan fertilisasi sperma (Muchlisin, 2005). Secara umum, terdapat dua tipe ekstender yang dikembangkan untuk pengawetan sperma ikan yaitu seminal plasma-mimicking media dan larutan karbohidrat sederhana seperti glukosa,

fruktosa dan laktosa (Babiak *et al.*, 2001). Fruktosa dan glukosa adalah komponen utama yang ditemukan dalam madu, sedangkan unsur minor lainnya terdiri dari asam organik, mineral, protein, senyawa fenolik dan asam amino bebas (Akbulut *et al.*, 2009). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemanfaatan madu sebagai ekstender bukan hanya berperan sebagai pengencer sperma tetapi juga mampu berfungsi sebagai penyedia sumber nutrisi bagi spermatozoa sehingga sperma dapat bertahan lebih lama (Ogretmen, 2014; Sunarma *et al.*, 2010) Ekstender yang baik bukan hanya sebagai pengencer sperma tetapi juga harus mampu berfungsi sebagai pengontrol kondisi pH dan penyedia sumber nutrisi bagi spermatozoa sehingga fungsionalitas dan kapabilitas sperma dapat dipertahankan (Tiersch, 2006).

BAHAN DAN METODA

Tempat dan Waktu

Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Balai Pembibitan dan

Hijauan Pakan Ternak (BPHPT) / Balai Inseminasi Buatan (BIB) Sembawa pada bulan April sampai dengan Mei 2019.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan gabus, kuning telur, alkohol 70%, madu, gliserol 10%, NaCl 0,9, akuades, penicillin, streptomycin, eosin, nitrogen cair.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, tabung *corning* 15 ml, spuit 1 ml, *straw* 0,25 ml, kainester, *container* mikroskop, kertas saring, tabung berskala, UV *ray stabilizer*, *refrigator*, *cool top*, lemari pendingin, *water bath*.

Metoda

Rancangan Percobaan

Percobaan ini menggunakan *response surface methodology* (RSM) yang terdiri dari satu variabel ekstender madu 300, 400, 500 mg.ml⁻¹, dilakukan pengulangan 3 kali.

Komposisi bahan perlakuan adalah sebagai berikut :

Kontrol:	NaCl 0,9 %	} + 10% (v/v) Gliserol + 10% b/v)KuningTelur
Perlakuan 1 (P1) :	300 mg.ml ⁻¹ Madu	
Perlakuan 2 (P2) :	400 mg.ml ⁻¹ Madu	
Perlakuan 3 (P3) :	500 mg.ml ⁻¹ Madu	

Cara Kerja

Pengambilan Sperma Ikan Gabus

Indukan jantan yang digunakan adalah indukan yang berukuran minimal 900 g dan sudah matang gonad. Pembedahan ikan dilakukan dengan memotong bagian abdominal, kemudian gonad ikan dipisahkan dari organ lainnya. Pengambilan sperma dilakukan dengan menggunakan spuit suntik 1 ml hingga tabung spuit terisi penuh atau sperma telah habis. Selanjutnya sperma yang telah dihisap di simpan didalam *styrofoam* yang berisikan es batu sebagai pendingin

Karakteristik Sperma Segar Ikan Gabus

Sampel sperma yang di dapat dari induk jantan ikan gabus kemudian dilakukan pemeriksaan kualitas sperma. Pengamatan karakteristik sperma meliputi warna, pH, konsentrasi, dan volume sperma. Pengamatan warna sperma dilakukan secara visual, sedangkan untuk

pengamatan pH sperma diukur dengan menggunakan pH indikator. Pengamatan volume sperma ukur dengan membaca langsung pada tabung berskala.

Pemeriksaan motilitas, viabilitas dan morfologi sperma ikan gabus Sperma ikan gabus diteteskan sebanyak satu tetes di atas gelas objek kemudian ditempelkan cover gelas. Pada tepi cover gelas diteteskan akuades lalu dilihat pergerakan sperma setelah terkena air di bawa mikroskop inverted. Penilaian motilitasnya berdasarkan kriteria penilaian motilitas oleh (Guest *et al.*, 1976). Penilaian viabilitas dan morfologi akan dianalisa secara deskriptif. Pengamatan sperma ini dilakukan sebelum dan setelah proses kriopreservasi H-1, dan H 7.

Pembuatan Kriomedia

Kriomedia yang dibuat mengacu pada penelitian Sumathi (2004) dan Ogretment (2014). Kuning

telur telah dipisahkan dari putih telur diletakkan di atas kertas saring dengan tujuan meminimalisir putih telur yang masih melekat. Setelah bersih, kuning telur dimasukkan ke dalam gelas ukur.

Krioprotektan (gliserol 10%) dan kuning telur (10% dari volume total kriomedia) dicampur terlebih dahulu kemudian ditambahkan ekstender (madu sesuai perlakuan). Setelah digabungkan, kriomedia dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stir bar diatas hot plate dengan suhu 40 °C selama 15 menit. Selanjutnya larutan disimpan dalam lemari es (10°C) selama 3 hari, lalu diambil supernatannya dan dicampurkan dengan Penicillin dan Streptomycin masing-masing sebanyak 0,02 ml per perlakuan.

Proses Kriopreservasi

Proses kriopreservasi terdiri dari 4 tahapan yaitu pembuatan larutan sperma, pengisian larutan sperma ke dalam *straw* (*filling* dan *sealing*), *equillibration* dan *storage*. Larutan sperma dibuat dengan cara mencampurkan sperma dan kriomedia ke dalam tabung *corning* dengan rasio 1:10 atau 0,25 ml sperma :2,25 ml kriomedia (Sumathi, 2004).

Homogenisasi dilakukan segera setelah pencampuran dengan cara memutar tabung membentuk pola angka delapan sebanyak 5 kali. Selanjutnya larutan sperma di simpan di dalam *cool top* selama 5 jam dengan suhu 5 °C. Pengisian larutan sperma ke dalam *straw* dilakukan dengan menggunakan mesin *filling*. Setelah terisi, ujung *straw* ditutup dengan menggunakan *sealer* khusus. Proses *filling* dan *sealing* dilakukan di dalam *cool top* pada suhu 5 °C. Tahapan berikutnya adalah *equilibration* yaitu pembekuan tahap pertama dengan menggunakan nitrogen cair pada suhu -140 °C selama tujuh menit. Selanjutnya adalah penyimpanan larutan sperma ke dalam kontainer pada suhu -196 °C. Proses *thawing* pada penelitian ini menggunakan suhu 35°C selama 30 detik dengan menggunakan *water bath*. Proses pencairan dilakukan pada H-1 dan H-7 setelah kriopreservasi.

Parameter Yang Diamati

Motilitas

Motilitas spermatozoa ikan gabus ditentukan dari banyaknya jumlah spermatozoa yang bergerak dari suatu lapang pandang. Pergerakan

yang terbaik adalah pergerakan yang progresif atau gerak maju. Apabila kebanyakan spermatozoa telah berhenti bergerak, maka dianggap mati. Dalam penelitian ini penilaian motilitas dicatat dari detik awal

spermatozoa aktif hingga detik akhir, pengamatan tersebut dilakukan sebelum kriopreservasi dan H-1, H-4 dan H-7 setelah kriopreservasi Kriteria motilitas spermatozoa Guest *et al.* (1976) (Tabel 1).

Tabel 1. Kriteria motilitas spermatozoa (Guest *et al.*, 1976)

Kriteria	Skor
> 70% dengan rata-rata 85% (semua spermatozoa bergerak cepat dengan arah maju (<i>Progressively</i>) dengan pergerakan ekor bervariasi)	5
40-70% dengan rata-rata 55% (kebanyakan spermatozoa bergerak arah maju dan beberapa menunjukkan gerakan cepat)	3-4
10-40% (sedikit atau sangat sedikit spermatozoa menunjukkan gerak arah maju)	1-2
5-10% (kebanyakan spermatozoa tidak bergerak, kadang-kadang sedikit gerakan (bergetar) dan sedikit bergerak arah maju)	0,50-0,75
1-5% dengan rata-rata 3% (kebanyakan spermatozoa tatisti/tidak bergerak, kadang-kadang terlihat sedikit gerakan/bergetar)	0,25
0% (semua spermatozoa tatisti/tidak bergerak)	0

Morfologi

Morfologi spermatozoa normal dibagi menjadi 3 bagian utama yaitu kepala, tengah dan ekor. Spermatozoa yang memiliki bagian yang kurang atau berlebih dinyatakan sebagai spermatozoa abnormal. Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan pada H-0, H-1, H-4 dan H-7.

Viabilitas

Viabilitas adalah persentase hidup spermatozoa berdasarkan

perbedaan daya permeabilitas terhadap cairan eosin. Penyerapan eosin oleh spermatozoa menunjukkan sel tersebut mengalami kematian. Viabilitas di amati pada H-0, H-1 H-4 dan H-7.

Persentase viabilitas di hitung dengan rumus berikut:

$$\text{Viabilitas} = \frac{\sum \text{sperma hidup}}{\sum \text{totalsperma}} \times 100\%$$

Analisa Data

Morfologi dan motilitas sperma di analisa secara deskriptif dimana kualitas pergerakan sperma ikan gabus ditentukan menggunakan tabel skor

dari Guest *et al.* dalam Ernawati, 1999. Sedangkan viabilitas sperma di analisa secara statistik dengan *response surface methodology* dimana P2 dan persentase viabilitas hari ke 4 diambil sebagai nilai tengah dari konsentrasi madu dan waktu preservasi untuk menentukan konsentrasi dan waktu preservasi optimal.

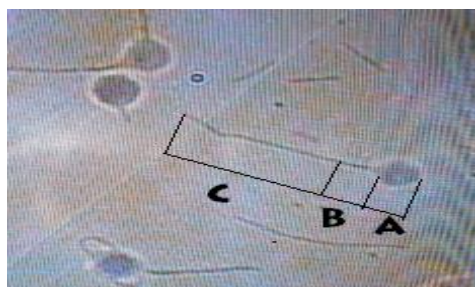
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pengamatan karakteristik sperma segar ikan gabus dapat dilihat pada Tabel 2. Sedangkan morfologi dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Karakteristik Sperma Segar Ikan Gabus

Parameter	Nilai
Volume	1,5 ml
pH	8
Warna	Putih Susu
Konsentrasi	2,212 x 10 ⁹ sel / ml
Motilitas	5 skor
Viabilitas	82 %



Gambar 1. Morfologi Sperma Ikan Gabus. (A) Kepala (B) Badan (C) Ekor

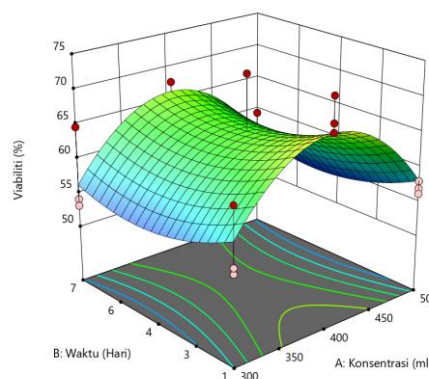
Hasil pengamatan motilitas sperma ikan gabus pasca kriopreservasi di sajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Motilitas Sperma Ikan Gabus

Perlakuan	Skor Motilitas (Hari ke -)		
	0	1	7
Kontrol	5	5	3,67
P1	5	5	3,03
P2	5	5	3,67
P3	5	5	3,03

Hasil pengamatan viabilitas sperma ikan gabus pasca kriopreservasi di sajikan pada Gambar 2.

$$Via = -90.44191 + 0.81358 A - 3.12372 B + 0.00040 AB - 0.00102 A^2 + 0.31918 B^2$$



Gambar 2. Grafik Pengaruh Waktu Penyimpanan dan Dosis Madu Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Gabus

Pembahasan

Sperma segar ikan gabus yang digunakan dalam penelitian ini sudah memenuhi standar kelayakan untuk kriopreservasi. Hal ini dapat dilihat dari karakter sperma yang telah

diamati (Tabel 1), dimana nilai viabilitas dan motilitas lebih dari 70%, dan morfologi lengkap (Refstie, 1983; Rustidja 2000). Konsentrasi sel dan nilai pH sperma ikan gabus yang diperoleh sebesar $2,212 \times 10^9$ sel/ml dengan nilai pH 8. Kondisi pH dan konsentrasi gula serta garam dalam larutan awetan sperma mempengaruhi motilitas sperma ikan, dimana pH diatas 4 merupakan kondisi lingkungan yang baik untuk sperma ikan (Dziewulska dan Pilarska, 2018).

Beberapa faktor yang mempengaruhi jumlah sel sperma pada ikan antara lain kondisi indukan (berat, panjang dan umur indukan), lingkungan pemeliharaan dan nutrisi indukan (Hajirezae *et al.*, 2010). Hal ini dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi sperma pada penelitian Sumathi (2004) yaitu hanya berkisar $1,78 \times 10^{10}$ sel/ml dengan pH 7,5. Keberhasilan kriopreservasi sperma sangat tergantung dengan kualitas sperma yang baik sebelum diawetkan (Horokhovatskyi *et al.*, 2018).

Ekstender yang baik harus bersifat isotonik, memiliki kapasitas buffer yang baik, mengandung nutrisi, bersifat antioksidan dan antibakterial (Agarwal, 2011). Secara umum madu

dapat digunakan sebagai pengganti ekstender teknis (NaCl dan KCl) pada konsentrasi 400 mg.ml⁻¹. Berdasarkan hasil penelitian, ekstender teknis memiliki persentase motilitas yang sama dengan perlakuan P2 setelah 7 hari penyimpanan. Pada konsentrasi madu 300 mg.ml⁻¹ dan 500 mg.ml⁻¹ nilai motilitas sperma lebih rendah dari kontrol dan P2. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut metabolisme sperma terganggu sehingga motilitas sperma lebih rendah.

Spermatozoa sangat terganggu dengan kondisi hubungan langsung terhadap lingkungan luar untuk aktivitas enzimatik yang biasanya dilakukan secara intraseluler dan juga penyediaan substrat energi spermatozoa. Metabolisme spermatozoa dapat berlangsung secara aerob maupun anaerob. Ketika terdapat oksigen, metabolisme fruktosa 9 kali lebih efisien dalam menghasilkan energi dan dimetabolisir secara sempurna (Hidayaturrahmah, 2007). Sebaliknya, jika ketersediaan oksigen tidak mencukupi maka metabolisme spermatozoa akan berjalan secara anaerob. Metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerob

menghasilkan asam laktat yang mengakibatkan penurunan pH di lingkungan sperma (Toelihere, 1985). Pada kondisi lingkungan yang asam, daya gerak spermatozoa akan menurun. Peningkatan konsentrasi laktat melebihi batas toleransi dapat menyebabkan kematian (Wicaksono dan Arifiantini, 2009).

Pengamatan viabilitas menunjukkan seluruh konsentrasi larutan madu yang digunakan untuk kriopreservasi berhasil mempertahankan sperma selama 7 hari penyimpanan, terjadinya penurunan persentase viabilitas pada pengamatan hari 1 hingga hari 7, hal ini dikarenakan energi pada kriomedia dapat digunakan berkurang karena digunakan oleh spermatozoa untuk terus menerus metabolisme seiring lama penyimpanan (Fujaya, 2002). Dengan hasil terbaik yang didapatkan dari P (2) 400 mg/ml dengan persentase viabilitas 64,15 % di hari 7. Energi yang didapatkan dari kandungan gula di dalam madu memberikan pengaruh terhadap nilai persentase viabilitas, adanya variasi kandungan gula didalam madu yang menjadi sumber nutrisi untuk metabolisme spermatozoa

memberikan efek yang berbeda pada konsentrasi 300, 400 dan 500 mg/ml, pada interaksi dengan larutan pengencer 500 mg/ml, ada efek yang diberikan pengencer pada proses kriopreservasi spermatozoa yang tidak terlalu bisa mempertahankan ketahanan hidupnya.

Hal ini terjadi pada variasi konsentrasi P(3) 500 mg/ml (56,95%), menurut Hidayaturahmah (2007) dan Hardjopranoto (1995), penurunan persentase hidup dalam proses penyimpanan dapat disebabkan oleh terhambatnya aktifitas metabolisme spermatozoa yang menghasilkan produk samping yang berupa asam laktat, dikarenakan jenuh nya kondisi ekstender terhadap oksigen sehingga metabolisme spermatozoa secara anaerob, menyebabkan terganggunya metabolisme sperma yang berujung kematian. Interaksi yang didapatkan pada P(1) 300 mg/ml (57,28%) memberikan efek yang kurang baik pada penyimpanan spermatozoa dibandingkan P(2) 400 mg/ml (64,15%) terhadap ketahanan hidup spermatozoa, hal ini diduga dosis madu pada pengencer yang diberikan lebih rendah sehingga sumber energi yang dibutuhkan spermatozoa kurang

tercukupi untuk bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama (Rahardhianto *et al.*, 2012).

Kesimpulan

Madu dapat digunakan sebagai ekstender pada kriopreservasi sperma ikan gabus dapat dimanfaatkan lebih lanjut, dengan hasil pengamatan Motilitas terbaik yang terjadi di hari ke 7 (tujuh) pada penelitian ini adalah pada P(2) dengan dosis madu 400 mg/ml dengan persentase 40-70% spermatozoa bergerak (skor 4) dan Viabilitas terbaik adalah P(2) dengan dosis madu 400 mg/ml dengan persentase sebesar 64,15% di hari ke 7 (tujuh) dengan Morfologi spermatozoa sebelum kriopreservasi dan sesudah kriopreservasi tidak mengalami kerusakan atau kelainan terhadap normalitas spermatozoa.

Saran

Sebagai kelanjutan dari penelitian ini observasi pada waktu penyimpanan sperma yang lebih lama, sangat dibutuhkan, untuk memastikan kelayakan penyimpanan sperma ikan gabus dalam waktu yang lama, sehingga dapat meningkatkan

keekonomian dan ketersediaan benih secara kontinu.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbulut, M., Özcan, M.M., & Çoklar, H., 2009 Evaluation of antioxidant activity, phenolic, mineral contents and some physicochemical properties of several pine honeys collected from Western Anatolia. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60, 7 577–589.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J. & Demianowicz, W. 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 56: 177–192.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W., Suquet, M. 1995. Sperm Physiology and Quality. In: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* pp. 25-52. Blackwell Science, Oxford.
- Boediono, A. 2003. Vitrifikasi vs pembekuan lambat pada pembekuan embrio. *Symposium Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI)*. Denpasar. hlm. 24 – 32.
- Chao, N.H. 1991. Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extension efforts. *International Symposium on Reproductive*

- Biology in Aquaculture*. Taipei: Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries Research Institute
- Diwan, A.D., S. Ayyapan, K.K. Lal, and W.S. Lakra. 2010. Cryopreservation of Fish Gametes and Embryos. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80 (4) : 109-124.
- Dziewulska, K., and Pilarska, M., 2018. Inhibitory effect of K⁺ ions and influence of other ions and osmolality on the spermatozoa motility of European burbot (*Lota lota* L.). *PLoS ONE* 13(5): e0196415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196415>
- Fitriliyani, I. 2005. *Pembesaran Larva Ikan Gabus, Channa striata dan Efektifitas Induksi Hormon Gonadotropin untuk Pemijahan Induk*, Tesis S2 (tidak dipublikasikan). Fakultas Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Gazali, M dan S. N. Tambing. 2002. *Kriopreservasi Sel Spermatozoa. Hayati*, 9 (1) : 27-32.
- Guest W.C, Avault J.W, Rousel J.A. 1976. Spermatogeny study of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Transactions of the American Fisheries Society*, 105(5):463-468.
- Hajirezaee. S., Amiri, B., M., and Mirvaghefi, A. 2010. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (54), pp. 9148-9154
- Horokhovatskyi, Y., Dietrich, M A., Lebeda, I., Fedorov, P., Rodina, M., Dzyuba, B. 2018. Cryopreservation effects on a viable sperm sterlet (*Acipenser ruthenus*) subpopulation obtained by a Percoll density gradient method, *Cryopreservation effect on sterlet sperm biodiversity*. *PLoS ONE*, pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202514>.
- Hossain, M.K., Latifa, G.A. and Rahman, M.M., 2008. Observations on induced breeding of snakehead murrel, *Channa striatus* (Bloch, 1793)', *Int. J. Sustain. Crop Prod.*, 3(5), pp. 65–68.
- Muchhlisin, Z. A., 2005. Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation, *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 6(1), pp. 66–69. doi: 10.13057/biodiv/d060114.
- Ögretmen, F. and İnanan, B. E. 2014. Evaluation of cryoprotective effect of Turkish pine honey on common carp (*Cyprinus Carpio*) spermatozoa, *Cryo-Letters*, 35(5), pp. 427–437. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.013.
- Sumathi, R.S. 2004 *Cryopreservation of spermatozoa of three fresh water fishes heteropneustus fossilis Channa striatus and Channa punctatus*. Manonmaniam Sundaranar University. Available at: <http://hdl.handle.net/10603/64457>.

- Sunarma, A., Budihastuti, D. W. and Sistina, Y. 2010. Penggunaan Ekstender Madu yang Dikombinasikan dengan Krioprotektan Berbeda pada Pengawetan Sperma Ikan Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842), *Omni-Akuatika*, 9(11), pp. 51–55
- Tiersch, T. R. 2006. Fish Sperm Cryopreservation for Genetic Improvement and Conservation in Southeast Asia. *Fish for the People*, 4(2):21-33.
- Weston, R.J. 2000 The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 71, 235-239.
- Yamaner, G., Ekici, A., Tuncelli, G., Memis, D., 2015. A Brief Overview On Cryopreservation Method Of Sturgeon Sperm, *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 30(2), pp. 14–20. doi: 10.18864/iujfas.11849.