

## **WAKTU MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA IKAN MAS (*Cyprinus carpio* L) PADA BEBERAPA KONSENTRASI LARUTAN FRUKTOSA**

**Hidayaturrahmah**

Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lambung Mangkurat  
Jalan Ahmad Yani km 35,8 Banjarbaru, Kalimantan Selatan, Indonesia  
Email: hidayah\_rmh@yahoo.com

### **ABSTRACT**

The research was aimed to reveal the effect of fructose concentration on the motility and viability time of carp's spermatozoa, and to determine the optimal concentration of fructose. A completely randomized design was applied with 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, and 4% fructose concentrations. Undiluted semen and aquades-diluted semen were used as controls. Fast progressive and slow progressive motility of spermatozoa were recorded as well as the viability time (in minutes) of the spermatozoa.

The results showed significant difference in motility and viability time of spermatozoa with different concentrations of fructose. The optimal average concentration was 3%, resulting in fast progressive motility of 11 seconds, slow progressive motility of 165 seconds, and viability time of 4 hours 46 minutes. The increase in motility and viability time were assumed to be related to the use of fructose as energy source and nutrition for spermatozoa.

Key words: motility, viability, spermatozoa, *Cyprinus carpio*, fructose, fast progressive, slow progressive

### **PENDAHULUAN**

Salah satu permasalahan fertilisasi pada budidaya ikan air tawar adalah rendahnya tingkat fertilisasi dari spermatozoa di dalam air. Hal ini mengakibatkan banyaknya sel telur yang tidak terbuahi secara

sempurna (Masrizal dan Efrizal, 1997). Dalam satu siklus reproduksi ikan dapat dihasilkan sel telur sampai jutaan per ekor, tetapi yang terbuahi hanya mencapai 5% dari total.

Permasalahan lain adalah kurangnya ketersediaan cairan spermatozoa pada waktu pembuahan buatan. Rendahnya pembuahan

spermatozoa dalam fertilisasi buatan ini juga disebabkan oleh aktivitas spermatozoa yang relatif singkat (Nurman, 1998). Hal tersebut dapat disebabkan oleh singkatnya waktu viabilitas dan motilitas dari spermatozoa, sehingga kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil pada sel telur rendah. Volume cairan spermatozoa dapat ditingkatkan dengan rangsangan hormonal, sedangkan menurut Masrizal dan Efrizal, (1997) volume cairan spermatozoa dapat juga dilakukan dengan pengenceran melalui penambahan larutan fisiologis.

Effendy (1997) menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1-2 menit. Menurut Suquest (1994) dalam Cosson *et al*, (1999) bahwa di alam durasi motilitas terjadi dalam periode yang sangat pendek pada ikan air tawar. Billard dalam Jamieson (1990) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa ikan dibatasi pada periode detik dan menit karena adanya *osmotic injury*.

Fertilisasi dapat didukung oleh kualitas spermatozoa yang baik. Untuk mengetahui tingkat ferilisasi yang lebih tinggi, perlu dicari larutan fisiologis yang dapat menambah daya motilitas dan viabilitas spermatozoa. Menurut Rustidja (1985) penggunaan larutan fisiologis yang mengandung NaCl dan urea dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa antara 20-25 menit.

Pada penelitian ini dipilih larutan fruktosa sebagai bahan pengencer untuk spermatozoa karena plasma semen secara biokimia mengandung berbagai persenyawaan organik spesifik yang salah satunya adalah fruktosa. Menurut Marawali dkk (2001) fruktosa adalah substrat energi utama di dalam plasma semen yang telah diproduksi kelenjar vesikularis. Selain itu fruktosa merupakan turunan karbohidrat yang dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung pergerakan (motilitas) dan ketahanan spermatozoa (Teolihere, 1981). Berdasarkan hal tersebut penelitian ini memfokuskan pada pengaruh pemberian larutan fruktosa di luar plasma semen untuk meningkatkan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L) sebagai ikan konsumsi yang umumnya banyak disukai masyarakat.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Dasar FMIPA Unlam. Bahan yang dipergunakan pada penelitian adalah: spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L) dan fruktosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) p.a.

### Persiapan Induk Jantan Ikan Mas

Menyiapkan induk ikan dengan menyeleksi ikan yang mempunyai tingkat kematangan gonad dewasa. Ikan mas jantan matang gonad berumur 8 bulan dan mempunyai ciri apabila di *stripping* pada

bagian anus mengeluarkan cairan putih susu berupa semen spermatozoa.

### **Pembuatan Larutan Fruktosa**

Pembuatan Larutan fruktosa dilakukan dengan cara melarutkan fruktosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) p.a. Variasi konsentrasi fruktosa yaitu dari 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5% dan 4%. Konsentrasi fruktosa dibuat dari jumlah 0,5-4 gram fruktosa yang masing-masing dilarutkan ke dalam 100 ml aquades. Sebagai kontrol adalah semen spermatozoa tanpa pengenceran dan semen spermatozoa dengan pengenceran aquades.

### **Stripping Spermatozoa Ikan Mas**

Tindakan *Stripping* terhadap ikan yang telah matang gonadnya dilakukan dengan mengurut bagian perut mengarah ke bagian ekor sampai keluar cairan putih. Cairan putih (semen) di letakkan ke dalam cawan petri dan dicampur dengan masing-masing variasi konsentrasi larutan fruktosa.

### **Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa**

Pengamatan dilakukan dengan mikroskop yang dihubungkan dengan kamera digital dan perekaman waktu menggunakan program paket komputer Video Snazzy untuk melihat lamanya waktu motilitas *fast progressive* dan *slow progressive* serta viabilitas. Pengamatan spermatozoa dilakukan dengan menghitung waktu spermatozoa dalam satu bidang pandang lensa mikroskop,

kemudian dilakukan analisis kuantitatif. Pengamatan untuk waktu motilitas spermatozoa dilakukan dengan mencatat waktu dalam satuan detik pada dua jenis motilitas: *fast progressive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak sangat cepat dengan arah maju kedepan) dan motilitas *slow progressive* (pergerakan spermatozoa yang bergerak cepat dengan arah maju kedepan). 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.

### **Rancangan Penelitian**

Eksperimen dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan perlakuan variasi konsentrasi larutan fruktosa 0,5 – 4%. Menurut Gomez dan Gomez (1983) penempatan untuk masing-masing perlakuan dan ulangan dilakukan secara acak. Spermatozoa ikan mas yang diamati berupa perhitungan waktu dalam detik untuk motilitas *fast dan slow progressive*, dan dalam menit untuk pengamatan viabilitas yang telah direkam dengan program video Snazzy. Pemberian variasi konsentrasi larutan fruktosa di mulai dari 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% dan sebagai kontrol adalah semen spermatozoa tanpa pengenceran dan semen spermatozoa dengan penambahan aquades. Ulangan variasi konsentrasi dilakukan sebanyak 6 kali dan hasil konsentrasi larutan

fruktosa yang telah didapat akan diulang kembali sebanyak 9 kali ulangan.

### Analisis Data

Data dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat bersifat tidak normal akibat adanya variasi yang timbul akibat perlakuan. Karena itu data diuji kenormalannya dengan uji Kolmogorof-Smirnov yang disesuaikan oleh Liliefors dan uji homogenitas (Dude dan Satya, 1995). Uji homogenitas yang digunakan adalah uji Levene (Levene test) dengan menggunakan program SPSS.

Apabila asumsi diatas terpenuhi maka dilakukan pengujian dengan *analysis of variance* (ANOVA). Dari hasil tersebut akan diperoleh nilai F hitung dan selanjutnya dibandingkan dengan F tabel 5 % dan 1 %, apabila nilai F hitung lebih kecil dari F tabel

5% maka diterima Ho atau ditolak H1, begitu pula sebaliknya (Hanafiah, 1993).

Jika populasi data tidak berdistribusi normal, maka dilakukan transformasi data. Jika transformasi tetap tidak memperlihatkan distribusi normal atau tidak homogen, maka diuji dengan statistik nonparametric yaitu Kruskal wallis (Santoso, 2001).

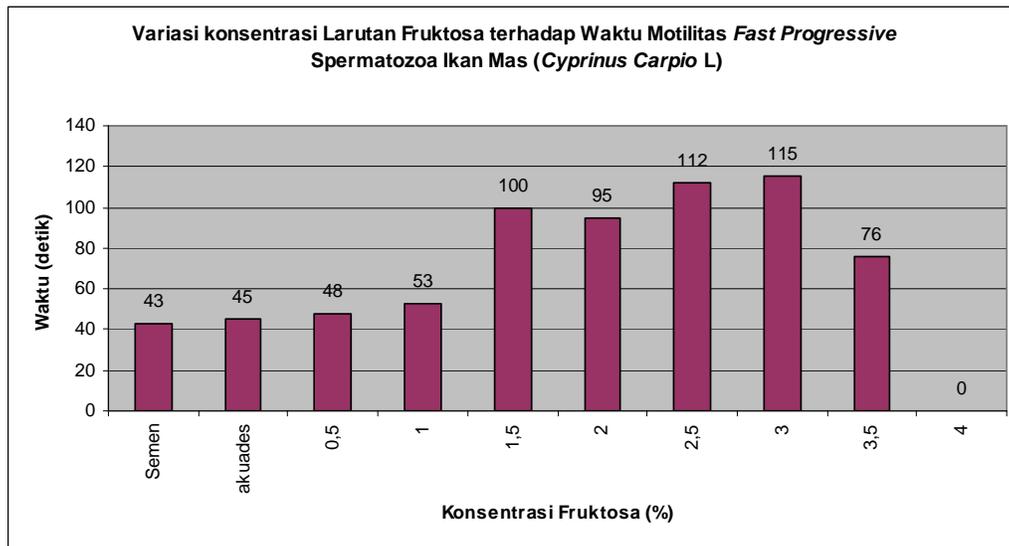
### HASIL

Data rata-rata variasi konsentrasi larutan fruktosa 0,5% - 4%, semen spermatozoa dan semen dengan pengenceran aquades sebagai kontrol terhadap waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata variasi konsentrasi larutan fruktosa terhadap waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas

NO.	Konsentrasi	Spermatozoa Ikan mas ( <i>Cyprinus carpio</i> L)					
		MFP	Std	MSP	Std	V	Std
1.	Semen	43	0,63	35	0,63	6,33	0,02
2.	akuades	45	0,63	52	1,26	5	0,03
3.	0,5 %	48	0,89	132	1,26	17,33	0,02
4.	1 %	53	0,89	64	1,26	57	0,01
5.	1,5 %	100	1,41	103	0,89	71,67	0,02
6.	2 %	95	0,89	185	0,89	123,33	0,03
7.	2,5 %	112	1,41	210	0,63	242,67	0,01
8.	<b>3 %</b>	<b>115</b>	0,89	<b>165</b>	0,63	<b>267,67</b>	0,02
9.	3,5 %	76	0,63	244	1,26	417	0,02
10.	4 %	0	0	0	0	1020	0,03

MFP: Motilitas *Fast Progressive* (detik); MSP: Motilitas *Slow Progressive* (detik); V: Viabilitas (menit); Std: Standar deviasi



Gambar 1. Waktu motilitas *fast progressive* spermatozoa ikan mas pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa

Berdasarkan sebaran atau distribusi datanya terdapat dua pilihan uji statistik yang dapat dilakukan untuk menganalisa data percobaan yaitu statistik parametrik dan statistik non parametric digunakan pada data yang bebas distribusi (tanpa ada asumsi normalitas dan homogenitas). Setelah dilakukan analisa distribusi homogen dan normal terhadap motilitas *fast progressive*, motilitas *slow progressive* dan viabilitas diperoleh data yang tidak normal, maka analisa data dilanjutkan ke uji nonparametrik Kruskal Wallis.

Berdasarkan perhitungan tersebut, semua nilai  $X^2_{hitung} > X^2_{tabel}$  maka  $H_0$  ditolak. Hal ini berarti bahwa terdapat pengaruh yang nyata terhadap waktu motilitas *fast progressive*, motilitas *slow progressive* dan viabilitas ikan mas. Selanjutnya dilakukan uji perbandingan berganda (*Multiple comparison*)

pada  $\alpha = 5\%$  yang menyatakan bahwa semua perlakuan berbeda nyata. Pada data diperoleh waktu motilitas dan viabilitas antara semen spermatozoa, semen dengan pengenceran aquades, serta variasi konsentrasi larutan fruktosa terjadi peningkatan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas yang sangat tinggi pada saat pemberian larutan fruktosa.

Berdasarkan uji lanjutan perbandingan berganda (*Multiple Comparison*) pada  $\alpha = 5\%$  bahwa semua perlakuan variasi konsentrasi larutan fruktosa berbeda nyata. Secara rata-rata perlakuan tersebut juga didapatkan motilitas *fast progressive* dengan konsentrasi fruktosa 3% memberikan waktu yang optimal pada ikan mas. Pada konsentrasi ini diduga dapat meningkatkan kualitas spermatozoa ikan lebih tinggi karena waktu

motilitas spermatozoa yang lama dan pergerakannya sangat aktif.

Pada ikan mas mempunyai rata-rata waktu motilitas *fast progressive* paling lama yaitu 115 detik atau sekitar 2,5 menit lebih tinggi dibanding konsentrasi lain. Waktu Motilitas *Slow progressive* didapatkan 165 detik dan viabilitas 267,67 menit (4 jam 46 menit). Konsentrasi optimal fruktosa dapat dilihat pada Gambar 1.

## PEMBAHASAN

Peningkatan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan variasi konsentrasi fruktosa tersebut diduga disebabkan fruktosa dapat dijadikan sebagai sumber energi dan nutrisi untuk spermatozoa. Adanya peningkatan waktu tersebut dapat memperpanjang daya tahan hidup dan keaktifan gerak spermatozoa. Menurut Soeparna (1980), pergerakan spermatozoa memerlukan energi seperti halnya pada sel-sel hidup lainnya.

Menurut Soehartojo (1995) bahan utama yang dipakai spermatozoa sebagai sumber energi dari luar testis adalah fruktosa yang diubah menjadi asam laktat dan energi dengan enzim fruktolisin. Faktor kedua diduga terjadinya peningkatan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa tersebut, adalah bahwa fruktosa dapat meningkatkan aktifitas protein yang terdapat pada ekor spermatozoa. Beberapa ahli mengatakan bahwa bagian tengah ekor spermatozoa disusun oleh

mikrotubulus yang mengandung substansi fiber yang disusun oleh protein dinein. Menurut Zaneveld (1978) dalam Purwaningsih (2000) protein dinein ini penting karena mempunyai aktivitas ATP-ase. ATP-ase akan lancar dan menyebabkan peningkatan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Faktor lain terjadinya peningkatan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa diduga pemberian fruktosa sebagai larutan fertilisasi dapat mengurangi kecepatan rusaknya permeabilitas spermatozoa dibanding air sebagai larutan fertilisasi yang terjadi di alam. Seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting perannya dalam metabolisme sel. Dengan mengurangi kecepatan rusaknya permeabilitas membran spermatozoa, maka kebutuhan akan nutrisi tidak terhambat dan sel spermatozoa tersebut dapat bertahan lama. Dalam hal ini Robertis & Robertis (1979) menyatakan bahwa permeabilitas membran erat kaitannya dengan transportasi nutrisi yang diperlukan pada metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Hal ini didukung oleh Jeyendran (1986) dalam Purwaningsih (2000) yang menyatakan, bahwa permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Menurut Effendy (1997) kemampuan spermatozoa hidup secara normal setelah keluar dari testis hanya berkisar antara 1–2

menit. Suquest (1994) dalam Cosson *et al*, (1999) mengatakan bahwa di alam durasi motilitas terjadi dalam periode yang sangat pendek pada ikan air tawar. Motilitas spermatozoa ikan dibatasi pada periode detik dan menit pada pembuahan ikan air tawar karena adanya *osmotic injury* (Billard, 1978). Menurut Billard, 1978; Maggese *et al* (1984) *osmotic injury* dapat diamati dalam spermatozoa setelah pelepasan kedalam medium pembuahan alami. Kerusakan ini tidak dapat diperbaiki dan bisa menyebabkan kematian dalam hitungan detik untuk beberapa jenis ikan air tawar (Jamieson, 1990). Dari data yang telah diperoleh pada penelitian ini ternyata waktu motilitas dan viabilitas tanpa perlakuan fruktosa menunjukkan waktu yang sangat singkat. Pada pengamatan semen spermatozoa tanpa diberi pengenceran apapun diperoleh motilitas *fast progressive* 43 detik, *slow progressive* 35 detik dan viabilitasnya 6 menit. Semen spermatozoa dengan pengenceran aquades diperoleh motilitas *fast progressive* 45 detik, *slow progressive* 52 detik dan viabilitasnya 5 menit.

Pada pemberian konsentrasi fruktosa 3 % terhadap waktu motilitas dan viabilitas telah didapatkan konsentrasi yang optimal untuk peningkatan kualitas spermatozoa ikan mas. Konsentrasi optimal adalah konsentrasi yang mempunyai waktu motilitas *fast progressive* yang paling lama yaitu lamanya waktu spermatozoa bergerak lincah sangat

cepat dengan arah maju kedepan untuk membuahi sel telur. Pada kondisi motilitas *fast progressive* diperkirakan proses fertilisasi tertinggi terjadi  $\pm 90\%$ . Hal ini dikarenakan spermatozoa bergerak sangat aktif dan memiliki kemampuan dan energi (ATP) yang sangat besar untuk menembus lubang mikropil sel telur. Kondisi motilitas *slow progressive* mempunyai kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil cukup lemah, pembuahan bisa saja terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat. Pada Kondisi viabilitas, kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi sangat kecil ( $\pm 10\%$ ). Kondisi spermatozoa yang bergerak perlahan atau berdenyut ditempat dalam mempertahankan viabilitasnya membutuhkan kecepatan dan energi yang besar untuk masuk ke saluran lubang mikropil sel telur.

Langkah pertama dalam penentuan konsentrasi optimal adalah dengan melihat lamanya waktu motilitas *fast progressive* dari spermatozoa. kemudian yang terakhir adalah waktu motilitas *slow progressive* dan viabilitas spermatozoa tersebut. Waktu motilitas dan viabilitas akan berbanding terbalik yaitu semakin meningkatnya waktu motilitas maka waktu viabilitas akan menurun. Motilitas *fast progressive* yang lama akan membutuhkan banyak energi untuk bergerak, sehingga mengakibatkan energi untuk bertahan hidup dan metabolisme untuk memperoleh nutrisi akan semakin berkurang

dan mengakibatkan viabilitasnya menurun. Keadaan viabilitas yang panjang belum tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi, karena pada keadaan ini spermatozoa sangat membutuhkan banyak energi untuk membuahi sel telur. Viabilitas yang lama ini merupakan keadaan dimana terjadi penurunan derajat metabolisme spermatozoa.

Penggunaan larutan fruktosa dapat meningkatkan derajat metabolisme spermatozoa (motilitas *fast progressive* tinggi dan viabilitas menurun). Derajat metabolisme spermatozoa adalah derajat dimana spermatozoa dapat menggunakan substrat energinya dan salah satu substrat energi spermatozoa adalah fruktosa. Penurunan derajat metabolisme dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa dalam penyimpanan. Sejumlah faktor memiliki kontribusi untuk mengurangi derajat metabolisme dan memperpanjang kehidupan spermatozoa dalam epididimis yang dapat bertahan lama. Sebaliknya didalam semen segar, spermatozoa hanya bertahan hidup selama beberapa jam jika derajat metabolismenya tidak ditekan (Marawali dkk, 2001).

Konsentrasi optimal yang didapatkan diduga bahwa kadar konsentrasi fruktosa di luar tubuh ikan hampir sama atau lebih rendah dengan kadar konsentrasi fruktosa dalam tubuh ikan. Kadar konsentrasi yang rendah dapat memudahkan spermatozoa untuk menyerap cairan fruktosa. Fruktosa adalah

senyawa kimia yang paling cepat dapat dirubah menjadi energi kalor atau energi gerakan bagi spermatozoa.

Menurut Billard (1978) komposisi organik milt (seminal plasma) dari *catfish* dan *carp* mempunyai energi substrat seperti glukosa dan fruktosa, laktase, piruvat, malat dan bahan yang lainnya dalam jumlah yang kecil pada spermatozoa. Berdasarkan tipe spermatozoa tersebut menyebabkan adanya beberapa perbedaan susunan kimia yang terkandung didalamnya. Haurbruge *et.al.*,(2000) mengatakan bahwa ikan *carp* dan *catfish* mempunyai biokimia spermatozoa dan proses spermatogenesis yang berbeda yaitu pada semen *carp* dapat dengan mudah dikeluarkan dengan cara di *stripping*.

Menurut Soehartojo (1995), di luar testis sel spermatozoa mampu memakai sumber energi dari luar untuk melanjutkan hidupnya. Bahan utama yang dipakai sebagai sumber energi dari luar adalah fruktosa yang akan diubah menjadi asam laktat dan energi dengan bantuan enzim fruktolisin. Pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Dibawah kondisi Aerob, metabolisme fruktosa adalah :



Ketika ada oksigen, metabolisme fruktosa adalah 9 kali lebih efisien dalam menghasilkan energi. Total energi dari 38 ATP adalah 266.000 kalori. Ketika terdapat O<sub>2</sub> yang cukup, molekul fruktosa dimetabolisir secara sempurna menjadi CO<sub>2</sub> dan air.

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa variasi konsentrasi fruktosa dapat meningkatkan waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan (*Cyprinus carpio* L). Peningkatan waktu motilitas dan viabilitas yang optimal pada spermatozoa terjadi pada konsentrasi fruktosa 3%. Pada konsentrasi optimal ini diperoleh rata-rata waktu *motilitas fast progressive* 115 detik (2,5 menit), *motilitas slow progressive* 165 detik dan viabilitas 267, 67 menit (4 jam 46 menit)

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih diucapkan kepada para dosen pembimbing yaitu Drs. Krisdianto, M.Sc., Dra. Rusmiati., M.Si dan Drs. Heri Budi Santoso, M.Si., yang telah memberikan masukan dan sarannya dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- 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, Cosson M-P. 1989. Measurement of sperm motility in trout and carp. In De Pauw, N, Jaspers, E, Ackefors, H, Wilkins N (eds). *Aquaculture a Biotechnology in Progress*, European Aquaculture Society, Bredene. pp: 747 – 753.
- Cosson J, Billard R, Cibert C, Dreanno C. 1999. *Ionic Factor regilating the Motility of fish sperm*. Villefranch. France.
- Dude E. J dan Satya, N. M. 1995. *Statistika Matematika Modern*. Penerbit ITB. Bandung
- Effendy, M.I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Nusatama. Bogor.
- Gomez, K.A. dan A.A. Gomez. 1983. *Statistical Prosedure for Agriculture Research*. John Wiley & Sons, Inc.
- Hanafiah K A. 1993. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Haubruege E, Petit F, Gage M, 2000. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol. *Proc. R. Soc. Biol. Ser. B*.267: 2333 - 2337
- Jamieson, B.G. M. 1990. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa (With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation*. Cambridge University Press. New York.
- Jeyendran RS, Zaneveld LJD. 1986. *Instruction influences for Hypoosmotic Swelling (HOS) Test*. Short Course Reproduction / Andrology and Non Hormonal contraception. Chicago.
- Maggese, M. C. Cukier, M. and Cyssac, V. E. 1984. Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. *Rev Brasil Bio* 44: 541-546
- Marawali Aloysius, Thomas mata hine, Burhanuddin, dan H.L.L belli. 2001. *Dasar-dasar Ilmu Reproduksi Ternak*. Departemen pendidikan nasional. Direktorat Jenderal Pendidikan

- Tinggi. Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri. Indonesia Timur. Kupang.
- Masrizal dan Efrizal. 1997. Pengaruh Rasio Pengenceran Mani terhadap Fertlisasi Sperma dan Daya Tetas Telur Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L). *Fisheries Journal Garing* 6: 1-9.
- Nurman. 1998. Pengaruh penyuntikan Ovaprim terhadap Kualitas Spermatozoa Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell). *Fisheries Journal Garing* 7: 34-42 .
- Purwaningsih E. 2000. Pengaruh Pemberian Ekstrak juice Buah Oyong Muda tanpa biji (*Luffa acutangula* R) secara in vitro terhadap kualitas spermatozoa. *Jurnal Kedokteran YARSI* 8: 70 - 74
- Robertis ED, Robertis EM. 1979. *Cell and Moleculer Biology*. Philadelphia: Saydesr College.
- Rustidja. 1985. *Pengantar Ilmu Reproduksi Ikan*. Fisheries Project Unibraw. Malang.
- Santoso S. 2001. *Buku Latihan SPSS Statistik Non Parametrik*. Alex Media Komputindo kelompok Gramedia. Jakarta.
- Soehartojo H. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Soeparna. 1980. *Pengantar Spermatologi, Masalah Khusus*. Fakultas Perikanan. IPB. Bogor.
- Suquet M, Dorange G, Omnes MH, Normant Y, Le Roux A, Fauvel C. 1993 Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J Fish Biol*. 42: 509 -516.
- Suquest M, Billard. R, Cosson J., Dorange G., Chauvaud I., Mugnier C., & Fauvel L., 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): A Comparison eith other freshwater and marine fish species. *Aquatic living Resources*. 7: 283 -294.
- Taborsky M. 2003. Sperm Competition in fish Bourgeois Males and Paracitic Spawning. *Trends in Ecology and Evolution* 13 : 222 – 227.
- Toelihere Mozes R. 1981. *Fisiologi Reproduksi Ternak*. Angkasa. Bandung.
- Zaneveld LJD. 1978. The Biology of human Spermatozoa. Dalam Wynn ED. *Obsterric and Gynecology Annual*. Appleton Century Croft. Chicago. pp: 15 – 40.