

## KUALITAS SPERMA IKAN BATAK (*Tor soro*) HASIL KRIOPRESERVASI SEMEN MENGGUNAKAN DIMETILSULFOKSIDA (DMSO) DAN GLISEROL 5, 10 DAN 15%

### Quality of sperm from cryopreserved semen of *Tor soro* in Dimethylsulfoxide and Glycerol 5, 10 and 15%

M. Zairin Jr.<sup>1)</sup>, S. Handayani<sup>1)</sup> dan I. Supriatna<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
<sup>2)</sup>Departemen Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

#### ABSTRACT

Attempt to produce a lot number of *Tor soro* is difficult if only obtained by natural spawning since they often get mature in dissimilar time. Stock of sperm kept in enough number for fertilization in anytime is needed to overcome the problem. Cryopreservation of semen is one of sperm cryopreservation methods using liquid nitrogen (-196°C) to quickly freeze the sperm. Several cryoprotectants can be utilized in cryopreservation. In this study, quality by means of motility of cryopreserved sperm using dimethylsulfoxide or glycerol as cryoprotectant in the dose of 5, 10 and 15% were analyzed. The result of study show that percentage of sperm motile after cryopreservation using dimethylsulfoxide and glycerol was similar ranged from 76.7 to 83.3%. Therefore, both cryoprotectant used in this study could be employed for cryopreservation of *Tor soro* sperm.

Keywords: cryopreservation, dimethylsulfoxide, glycerol, sperm, *Tor soro*

#### ABSTRAK

Upaya produksi ikan batak (*Tor soro*) dalam jumlah besar relatif sulit jika hanya mengandalkan hasil pemijahan secara alami karena kematangan gonad antara ikan jantan dan betina sering tidak bersamaan. Untuk mengatasinya diperlukan stok sperma yang disimpan dalam jumlah yang cukup banyak untuk pembuahan yang dapat dipakai setiap saat. Kriopreservasi semen merupakan salah satu cara penyimpanan sperma yang menggunakan larutan nitrogen cair (-196°C) untuk membekukan sperma secara cepat. Beberapa jenis protektan dapat digunakan dalam pembekuan sperma. Pada penelitian ini, dilakukan analisis kualitas dalam arti motilitas sperma hasil kriopreservasi menggunakan dimetilsulfoksida dan gliserol sebagai krioprotektan dengan dosis 5, 10 dan 15%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase sperma motil setelah dilakukan kriopreservasi adalah sama, berkisar antara 76,7% hingga 83,35%. Dengan demikian, kedua jenis krioprotektan yang digunakan dalam penelitian ini bisa dipakai dalam kriopreservasi sperma ikan batak.

Kata kunci: kriopreservasi, dimetilsulfoksida, gliserol, sperma, *Tor soro*

#### PENDAHULUAN

Ikan batak atau lebih populer disebut ihan telah lama dikenal masyarakat Batak di Sumatera Utara sebagai ikan adat. Ikan tersebut digunakan sebagai syarat pada upacara adat seperti pernikahan dan kelahiran anak. Di Kuningan Jawa Barat, ikan ini lebih dikenal sebagai ikan keramat, kanca atau ikan dewa karena dianggap sebagai ikan pembawa petaka bila masyarakat umum menangkap atau memakannya. Namun populasi ikan tersebut mulai menurun dan

terancam punah akibat degradasi lingkungan seperti pencemaran dan penangkapan berlebih (Tjahjo *et al.*, 1995). Upaya pelestarian telah dilakukan diantaranya melalui *restocking* di Danau Toba dan lokasi objek wisata Cibulan, Darmaloka, Pesawahan, Jawa Barat (Asih dan Subagja, 2003). Kegiatan koleksi *ex situ* yang telah dilakukan antara lain penelitian plasma nutfah, karakterisasi, pakan dan nutrisi serta pengembangbiakan ikan batak *Neolissochillus thienemanni* dan *Tor soro* melalui pembenihan.

Upaya produksi ikan batak dalam jumlah besar tidak mudah jika hanya bergantung pada proses pemijahan secara alami. Pemijahan buatan dengan metode kawin suntik menjadi salah satu alternatif produksi benih dalam jumlah besar. Namun diperlukan sperma dengan kualitas bagus untuk proses pembuahannya. Kematangan gonad antara ikan batak jantan dan betina yang seringkali tidak bersamaan menjadi kendala dalam proses reproduksinya. Untuk mengatasinya diperlukan stok sperma yang dapat dipakai setiap saat dengan cara penyimpanan sperma sehingga terkumpul dalam jumlah yang cukup untuk pembuahan telurnya.

Penyimpanan sperma dapat dilakukan dengan menggunakan media simpan, temperatur rendah dan penambahan udara. Kriopreservasi semen merupakan salah satu cara penyimpanan sperma yang menggunakan larutan nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) sebagai cairan pembeku dengan cairan krioprotektan untuk melindungi sel spermanya. Saat ini  $\pm 200$  spesies ikan di dunia yang berhasil diawetkan semennya menggunakan teknik kriopreservasi (Glogowski *et al.*, 2002), diantaranya ikan mas (*Cyprinus carpio*) (Kurokura *et al.*, 1984), lele Afrika (*Clarias gariepinus*) (Urbayi *et al.*, 1999) dan ikan salmon Atlantik (*Salmo salar*) (Stoss dan Refstie, 1983).

## BAHAN & METODE

### Persiapan kuning telur

Proses penelitian dilakukan di Instalasi Riset Perikanan Air Tawar, Cijeruk dan Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan, Departemen Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran hewan IPB. Sterilisasi kuning telur dilakukan dengan menggunakan alkohol 70% dan dikeringkan. Telur tersebut dipecahkan dan dipisahkan antara bagian putih dan kuning telurnya. Kuning telur yang masih terbungkus selaput vitelin diletakkan di atas kertas saring sehingga putih telurnya terserap dan bersih. Selaput vitelin yang masih melekat pada kuning telur dipecahkan dan kuning telur dimasukkan dalam gelas ukur.

### Pembuatan gliserol dan dimetilsulfoksida

Pembuatan gliserol dan dimetilsulfoksida 5% sebanyak 10 ml, diawali dengan memasukkan 9 ml larutan ringer ke dalam gelas dan ditambahkan gliserol atau dimetilsulfoksida sebanyak 0,5 ml serta 0,5 ml kuning telur. Hal ini dimaksudkan agar tidak terjadi pengendapan kuning telur didasar gelas ukur sehingga larutan menjadi homogen. Antibiotik berupa *Penicillin* dan *Streptomycin* masing-masing sebanyak 0,02 ml dicampurkan kedalamnya untuk menghambat pertumbuhan kuman dalam semen yang diencerkan (Toelihere, 1993). Demikian juga dalam pembuatan gliserol dan dimetilsulfoksida 10% dan 15%, larutan ringer dimasukkan ke dalam gelas ukur yang berbeda sebanyak 8,5 ml dan 8 ml serta 0,5 ml kuning telur.

### Pemeriksaan dan penentuan kualitas semen segar ikan batak

Pengambilan semen dilakukan pada pagi hari dengan cara mengurut ikan jantan uji. Sperma dihisap menggunakan alat suntik dan ditampung dalam gelas ukur. Penambahan udara pada alat suntik yang berisi semen dilakukan dengan perbandingan 1 : 1 sebagai suplai oksigen untuk spermatozoa sehingga diharapkan dapat memperpanjang waktu penyimpanan. Selama pengambilan, semen dihindarkan dari air dan sinar matahari langsung karena dapat menyebabkan kematian sperma. Setelah terkumpul dalam gelas ukur, diambil 10 ml semen untuk pengamatan makroskopis (volume, warna, pH dan konsistensi) dan mikroskopis (gerakan massa, motilitas, konsentrasi spermatozoa dan sperma yang hidup dan mati).

### Pemeriksaan gerakan massa sperma

Pemeriksaan gerakan massa sperma dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran  $10\times 10$  dengan cahaya rendah. Berdasarkan gerakan massa, kualitas semen dapat ditentukan sebagai berikut (Toelihere, 193);

- a. Sangat baik (+++), terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif seperti

- gumpalan awan hitam yang bergerak cepat dan berpindah-pindah.
- Baik (++), bila terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban
  - Sedang (+), jika tidak terlihat gelombang, hanya gerakan individual aktif progresif
  - Buruk (N, *nekrospermia* atau O), bila hanya sedikit atau tidak ada gerakan-gerakan individual.

### Pemeriksaan motilitas

Sebanyak 1 tetes semen ditempatkan di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup untuk pemeriksaan motilitasnya. Pada tepi gelas penutup, ditetaskan akuades dan diamati motilitas semen dibawah mikroskop dengan perbesaran 10×40 dan penilaiannya didasarkan pada kriteria penilaian motilitas (Tabel 1).

### Penghitungan konsentrasi dan kelangsungan hidup spermatozoa

Semen dihisap menggunakan pipet *haemocytometer* sampai tanda 0,5 kemudian ditambahkan eosin 0,2% sampai garis diatas gelembung pipet (tanda 101) dan dikocok dengan pola angka 8. Penghitungan dilakukan pada kamar hitung *Neubauer* menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10×40. Jumlah sperma dihitung dalam 5 kamar (masing-masing memiliki 16 ruangan kecil) secara diagonal (4 sudut dan 1 sentral).

bila dari hasil perhitungan didapatkan Y spermatozoa, maka konsentrasi spermatozoa adalah  $Y \times 10 \times 10^6$  sperma/ml.

Penghitungan sperma yang hidup dan yang mati dilakukan terhadap preparat ulas semen yang dihasilkan. Semen yang diperoleh di teteskan pada gelas objek dan ditambahkan eosin 2% sebanyak 3-4 tetes dan diaduk menggunakan gelas objek lain sehingga homogen. Setelah homogen, campuran tersebut difiksasi di atas api dan diamati menggunakan mikroskop perbesaran 10×40 sebanyak 10 lapang pandang. Sperma yang hidup ditandai dengan warna putih pada kepalanya dan merah untuk sperma yang mati.

### Pembekuan dan penyimpanan sperma

Sisa semen yang terkumpul pada gelas ukur diambil menggunakan alat suntik (*syringe*). Sebanyak 2 ml semen dicampur dengan larutan pengencer (*ringer*) dan krioprotektan dalam botol dengan perbandingan 1 : 3 (Stoss, 1983). Sebelum dibekukan, semen yang telah diencerkan disimpan pada lemari pendingin (3-4°C) selama 3-4 jam.

Semen uji yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam *straw* 0,25 ml yang telah disimpan di lemari pendingin, dengan cara menyedotnya pada bagian ujung yang ditutup polyvinil alkohol (PVA). Pekerjaan ini dilakukan dilemari pendingin untuk mencegah terjadinya kenaikan suhu secara

Tabel 1. Kriteria motilitas spermatozoa (Guest *et al.* dalam Ernawati, 1999)

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 immotil/tidak bergerak, kadang-kadang terlihat sedikit gerakan/bergetar)	0,25
0% (= semua spermatozoa immotil/tidak bergerak)	0

drastis. Pada tahap pertama *straw* diletakkan didalam uap nitrogen cair hingga mencapai suhu kurang dari  $-150^{\circ}\text{C}$  dalam styrofoam selama 15 menit. Pada tahap kedua, *straw* dimasukkan dalam kanister dan disimpan dalam kontainer yang telah diisi dengan nitrogen cair. Selanjutnya *straw* disimpan dalam kontainer  $\text{N}_2$  cair selama lebih dari satu minggu.

### **Pengamatan kualitas sperma sebelum pembekuan dan sesudah pencairan**

Pemeriksaan kualitas sperma sebelum pembekuan dilakukan setelah sperma disimpan didalam *plastic straw* 0,25 ml pada suhu  $3-4^{\circ}\text{C}$  selama 4 jam. Pemeriksaan kualitas sperma secara mikroskopik dilakukan pada hari ketujuh yang dilakukan dengan proses pencairan (*thawing*) terlebih dahulu pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik.

Spermatozoa dalam suatu kelompok mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersamaan kesatu arah dalam bentuk gelombang-gelombang tebal atau tipis, kecepatan pergerakannya bergantung pada konsentrasi spermatozoa yang hidup didalamnya. Pergerakan yang terbaik adalah pergerakan yang progresif atau gerak maju. Gerakan melingkar atau mundur sering merupakan tanda-tanda *cold shock* atau media yang tidak isotonik dengan spermatozoa. Gerakan berayun atau berputar-putar ditempat sering terlihat pada spermatozoa tua. Apabila kebanyakan spermatozoa telah berhenti bergerak, maka dianggap mati (Toelihere, 1993).

### **Rancangan percobaan**

Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari dua variabel yaitu dimetilsulfoksida (DMSO) dan gliserol dengan konsentrasi masing-masing 5%, 10% dan 15 % (masing-masing 3 ulangan).

## **HASIL & PEMBAHASAN**

### **Karakteristik semen ikan batak (*Tor soro*)**

Berat tubuh ikan batak (*Tor soro*) ternyata tidak mempengaruhi volume semennya, terbukti dengan volume semen

yang didapatkan dari ikan berbobot 2,2 kg sebanyak 3 ml sama dengan volume yang didapatkan dari ikan berbobot 0,68 kg. Volume semen yang didapatkan dari ikan uji berkisar antara 2-6 ml dengan rata-rata 3,92 ml. Perbedaan volume semen yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh kondisi ikan selama pemeliharaan, nutrisi dan lingkungan pemeliharaan (Ernawati, 1999; Tang, dan Affandi, 2000). Berdasarkan penelitian Ginzburg (1972), volume semen ikan air tawar pada umumnya bervariasi antara 0,2-3,55 ml. Konsentrasi spermatozoa dari semen segar yang diperiksa dengan *haemocytometer* dari 6 kali ulangan adalah  $17,70 \times 10^9$  sel/ml. Konsentrasi tersebut sesuai dengan hasil penelitian Ginzburg (1972) yaitu berkisar antara  $7,6-28 \times 10^9$  sel/ml untuk ikan Cyprinidae. Konsentrasi ikan bervariasi tidak hanya pada ikan jantan yang berbeda pada spesies yang sama, namun juga pada ikan jantan yang sama.

Karakteristik semen segar ikan batak dapat dilihat pada Tabel 2. Pada semen ikan uji tidak terlihat adanya gerakan massa karena sperma bersifat immotil dalam air mani (Ginzburg, 1972) dan akan bergerak aktif bila terkena air (Tang dan Affandi, 2000). Nilai pH ikan batak tersebut berkisar antara 7,6-7,9 dengan konsistensi kental dan berwarna putih susu serta bergerak aktif selama 2 menit 15 detik dengan motilitas 76,67% dan skor progresif antara 4-5. pada umumnya sperma sangat aktif dan tahan hidup lama pada pH sekitar 7 (Tang dan Affandi, 2000). Motilitas sperma menggambarkan kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur. Semakin tinggi nilai motilitasnya maka semakin tinggi pula persentase hidup spermatozoa. Dengan karakteristik tersebut, maka semen segar ikan batak (*Tor soro*) yang digunakan memenuhi persyaratan untuk proses pembekuan karena semen segar yang akan dibekukan harus mempunyai motilitas minimal 70% (Refstie, 1983).

### **Motilitas spermatozoa sebelum pembekuan dan setelah pencairan**

Persentase mortalitas spermatozoa sebelum pembekuan pada keenam pengencer adalah cenderung stabil. Hal ini

Tabel 2. Karakteristik semen segar ikan batak (*Tor soro*)

Parameter	Satuan	Keterangan
Volume	ml	3,92 ± 1,44
Warna	-	Putih susu
Konsistensi	-	Kental
pH	-	7,6 – 7,9
Gerakan massa	+/-	-
Motilitas	%	76,67 ± 5,37
Konsentrasi spermatozoa	10 <sup>9</sup> sel/ml	17,70 ± 5,07
Persentase hidup	%	89,5 ± 3,31

dikarenakan pengencer berupa dimetilsulfoksida dan gliserol serta kuning telur memberikan perlindungan pada spermatozoa secara intraseluler dan ekstraseluler. Mekanisme perlindungan intraseluler oleh dimetilsulfoksida dan gliserol terjadi dengan memasuki sel dan menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit tersebut dan mengurangi daya perusakannya terhadap spermatozoa (Toelihere, 1993). Perlindungan secara ekstraseluler diberikan oleh lipoprotein yang terdapat dalam kuning telur ayam dengan jalan menyelimuti spermatozoa. Kuning telur memberikan perlindungan terhadap *cold shock* selama proses pembekuan dengan menstabilkan membran spermatozoa.

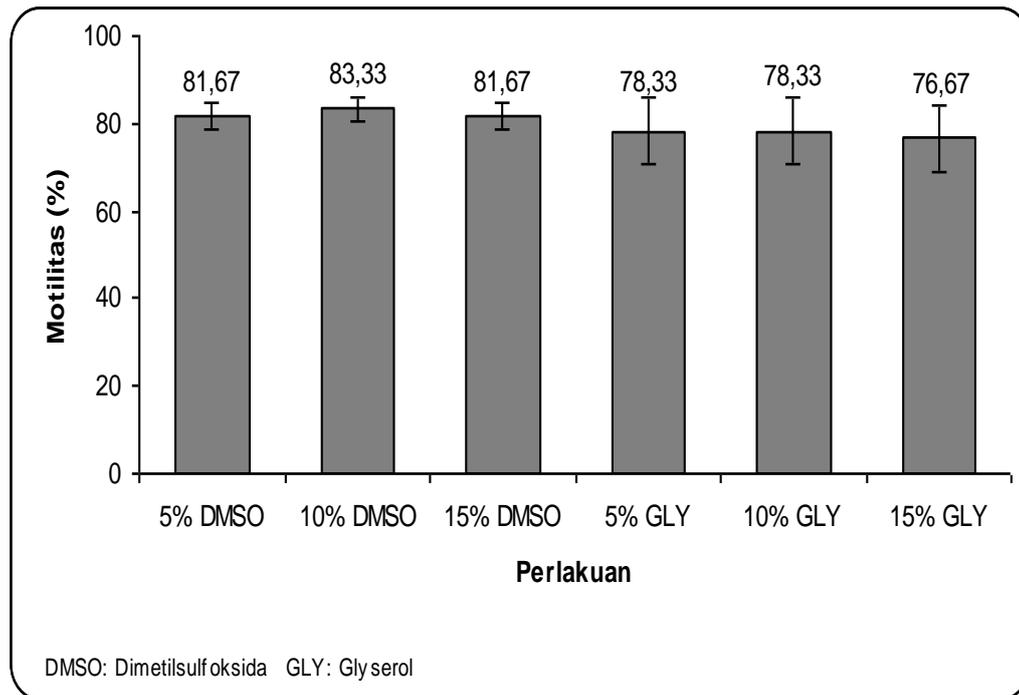
Penurunan motilitas secara drastis terjadi pada perlakuan gliserol 5% dan 15% yang disebabkan oleh perubahan-perubahan intraseluler pada sel sperma yang dibekukan akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal-kristal es. Hal ini dapat menyebabkan perubahan fisik (ultrastruktural) dan kimia pada spermatozoa. Perubahan ultrastruktural menyebabkan hilangnya kelangsungan hidup (viabilitas) spermatozoa (Jones dan Stewart, 1979). Kerusakan 20% dari seluruh spermatozoa pada waktu pembekuan masih dianggap memuaskan (Toelihere, 1993).

Kadar optimum gliserol untuk pengencer sitrat-kuning telur berkisar antara 7,0 – 7,6% volume dan dalam pengencer susu sekitar 10% (Toelihere, 1993). Penggunaan gliserol sebanyak 5% dan 15% diduga kurang

optimal dalam menggantikan air bebas dan mendesak keluarnya elektrolit-elektrolit yang keluar terlalu berlebihan atau sebaliknya. Penggunaan gliserol yang terlalu banyak juga dapat bersifat toksik bagi spermatozoa.

Dimetilsulfoksida (DMSO) akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa pada konsentrasi yang optimal. Gangguan terhadap spermatozoa akan terjadi jika konsentrasi DMSO tidak optimal, terlihat pada penambahan DMSO 5% dan 15% yang menghasilkan persentase motilitas yang lebih rendah dibanding penambahan sebanyak 10%. Penambahan DMSO kedalam pengencer mempengaruhi proses pembekuan dan pencairan kembali dengan mencegah kerusakan dan kematian spermatozoa. Mekanisme kerja DMSO dan gliserol diduga sama karena keduanya merupakan *permeating cryoprotectant* yang bekerja pada laju pendinginan lambat (Stoss, 1983). DMSO masuk kedalam sel dan menggantikan air bebas dan mendesak keluarnya elektrolit-elektrolit intraseluler sampai pada titik konsentrasi yang tidak berbahaya selama pembekuan.

Hasil pengamatan membuktikan bahwa penambahan DMSO 10% memberikan nilai optimum pada mekanisme kerjanya dan dengan penambahan kuning telur sebesar 5% dapat membantu melindungi spermatozoa selama proses pembekuan dan pencairan. Hasil penelitian Masrizal (1991) juga membuktikan bahwa penambahan kuning telur sebanyak 5% pada semen ikan mas menghasilkan motilitas pasca pencairan yang lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian



Gambar 1. Pengaruh dosis dimetilsulfoksida dan gliserol terhadap motilitas sperma ikan batak.

kuning telur sebanyak 10% atau 15%. Sedangkan dimetilsulfoksida telah banyak dipakai pada kriopreservasi semen ikan salmon dan terbukti memberikan perlindungan yang baik terhadap spermatozoa (Stoss, 1983). Dimetilsulfoksida lebih sesuai dipakai sebagai krioprotektan untuk spermatozoa ikan air tawar dibandingkan dengan gliserol. Penggunaan krioprotektan didasarkan pada komposisi semen ikan, pada ikan air tawar memiliki komposisi gliserol pada seminal plasma lebih rendah dibandingkan ikan air laut, kecuali ikan *Coregonus muksun*.

## KESIMPULAN

Dimetilsulfoksida dan gliserol yang digunakan sebagai krioprotektan memiliki pengaruh yang sama terhadap kualitas sperma ikan batak sebelum pembekuan. Keduanya bersifat intraseluler dan tidak toksik terhadap sel sperma. Penambahan DMSO 5% dan 10% dalam pengencer kuning telur-larutan Ringer tidak memberikan pengaruh nyata dalam mempertahankan mortalitas spermatozoa

ikan batak (*Tor soro*) selama proses pembekuan.

Karakteristik semen segar ikan batak (*Tor soro*) yang diamati antara lain;

Volume rata-rata	: 3,92 ml
Warna	: putih susu
Konsistensi	: kental
pH	: 7,6-7,9 (netral)
Konsentrasi spermatozoa	: $17,70 \times 10^9$ sel/ml
Gerakan massa	: tidak ada
Motilitas	: 76,67%
Skor progresif	: 4 - 5
Kelangsungan hidup	: 89,5%

## DAFTAR PUSTAKA

Asih, S. dan J. Subagja. 2003. Pembenuhan ikan batak (*Tor soro*) mendukung perikanan berbasis budidaya (CBF = Culture Base Fisheries). Disampaikan dalam sosialisasi pengembangan ikan yang berbasis budidaya di Danau Toba, Prapat tanggal 5 Februari 2003.

Davy, F. B. and A. Chouinard. 1980. Induced fish breeding in Southeast Asia. IDRC-178. p: 17-20.

- Ernawati, Y. 1999. Efisiensi implantasi LH-RH dan  $17\alpha$ -metiltestosteron serta pembekuan sperma dalam upaya peningkatan produksi benih ikan jambal siam (*Pangasius hypophthalmus*). Disertasi. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Ginzburg, A. S. 1972. Fertilization on fishes and the problem of polyspermy. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem. 366 hal.
- Glogowski, J., R. Kolman, M. Szcpekowski, A. Horvarth, B. Urbanyi, P. Sieczinski, A. Rzeieniecki, J. Domagala, W. Demianowicz, R. Kowalski, A. Cierezko. 2002. Fertilization rate of Siberiansturgeon (*Acipenser baeri* Bandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture*, 211: 367-373.
- Jones, R. C. and D. L. Stewart. 1979. the effect of cooling to 5°C and freezing and thawing on the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert*, 56: 233-238.
- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi. 1984. Cryopreservation of carp semen. *Aquaculture*, 37: 267-273.
- Masrizal. 1991. Penambahan dimethylsulfoksida dan kuning telur ayam kedalam pengencer untuk meningkatkan kualitas mani beku dan daya tetas telur ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Tesis. Pascasarjana, IPB. Bogor.
- Stoss, J. 1983. Fish gametes preservation and spermatozoan physiology. *In Fish Physiology Vol. IX Part B*. Academic Press Inc, London. P: 305-350.
- Stoss, J. and T. Refstie. 1983a. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30: 229-236.
- Tang, U. M. dan R. Affandi. 2000. Biologi reproduksi ikan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan . Institut Pertanian Bogor.
- Tjahjo, D. W. H., E. Setiadi, Kartamihardja, A. Hardjamulia, N. Suhenda, D. Sadili, Mursidin, Subagio, M. F Sukadi. 1995. studi khusus penangkaran ikan langka (ikan batak dan ikan suluk) di labuhan Batu dan Tapanuli Utara, Sumatera Utara. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Perikanan Air Tawar 1993-1994. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi buatan pada ternak. Angkasa. Bandung.