

**PEMBEKUAN SEMEN LELE DUMBO (*Clarias Gariepinus* BURCHELL 1822)  
SEBAGAI MODEL KRIOPRESERVASI SEMEN IKAN**

*(Freezing semen of lele dumbo *Clarias gariepinus* Burchell 1822 as a model of  
fish semen criopreservation)*

**L u t f i**

*Jurusan Perikanan, Fakultas Peternakan Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Negeri Papua, Manokwari 98314, Papua Barat*

**ABSTRACT**

*Effect of four types of diluents and four concentration of DMSO (5%, 10%, 15% and 20%) against the motility of African catfish sperm were evaluated after storage at freezing temperatures. The steps in preparation the 16 treatments combination of the diluents are preparation of diluents, mixing diluents with DMSO, packing of semen into 0.3-ml straw, equilibration of semen at 4 °C for 30 minutes, freezing of semen in nitrogen vapor liquid at a height of 6.5 cm for 10 minutes, and subsequently storage of semen in liquid nitrogen (-196 °C) for further analysis of post-thawing motility (PTM). The result showed that the highest level of motility of spermatozoa was in treatment P<sub>1</sub>D<sub>15</sub> (45.7 ± 4.3%) and the lowest was in treatment P<sub>2</sub>D<sub>20</sub> (14.5 ± 13.2%). The best diluent in this observation was diluents containing NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub>. The best concentration was DMSO 15%. While the best interaction between the concentration of DMSO diluents is P<sub>1</sub>D<sub>15</sub> treatments containing NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub> with a combination of 15% DMSO concentration. The conclusion of the research is that diluents containing NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> and NaHCO<sub>3</sub> with a combination of 15% DMSO concentration can be used in cryopreservation of African catfish semen.*

**Key words:** *C. gariepinus, semen, cryopreservation, the diluent, the concentration of DMSO.*

---

**PENDAHULUAN**

Lele dumbo (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) merupakan salah satu jenis ikan konsumsi air tawar dengan bentuk tubuh yang memanjang dan kulit yang licin. Lele dumbo juga merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki daging yang cukup lezat, mudah dicerna dan memiliki gizi yang tinggi. Selain itu, lele dumbo dapat tumbuh dengan cepat dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi pada lapisan masyarakat Indonesia. Menurut Pusat Data Statistik dan Informasi (2006), jumlah benih lele dumbo yang ditebar di seluruh Indonesia baik di kolam, sawah dan keramba pada tahun 1999 sebanyak 1.780.900 benih yang semakin meningkat pada tahun 2004 sebanyak 18.651.983 benih, dan diperkirakan kebutuhan benih lele akan semakin meningkat.

Kegiatan pemijahan lele dumbo secara alamiah masih menghadapi kendala seperti masalah musim pemijahan yang berbeda antara jantan dan betina.

Secara buatan fertilisasi dapat dilakukan, tetapi pada lele dumbo jantan, koleksi semen tidak dapat dilakukan menggunakan teknik *stripping* seperti pada ikan jantan lainnya. Sehingga untuk melakukan koleksi semen pada lele dumbo harus mengorbankan induk jantan, padahal jumlah semen yang diperoleh sangat banyak sehingga dibutuhkan teknik kriopreservasi untuk pengawetan bibit semen agar dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama.

Upaya kriopreservasi semen ikan telah banyak dilaporkan. Diantaranya oleh Kurokura *et al.* (1984) yang melakukan kriopreservasi ikan mas di dalam medium yang mengandung NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> dan NaHCO<sub>3</sub>. Sedangkan Horvath dan Urbanyi (2000) telah melakukan kriopreservasi semen lele dumbo menggunakan pengencer kombinasi fruktosa dan dimetilsulfoksida (DMSO). Penggunaan krioprotektan DMSO untuk kriopreservasi semen ikan telah dilaporkan,

diantaranya oleh Urbanyi *et al.* (1999), pada lele dumbo menggunakan pengencer fruktosa dikombinasikan dengan  $\text{NaHCO}_3\text{-CO}_2$  dengan konsentrasi DMSO 10% menghasilkan motilitas spermatozoa pasca-*thawing* 25%. Pada ikan patin, Kwantong dan Bart (2003), menggunakan NaCl dan DMSO 12% dengan fertilitas sebesar 40.8%. Akcay *et al.* (2004), melaporkan pengencer yang mengandung NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2$  dan  $\text{NaHCO}_3$  dengan DMSO 15% pada ikan mas kaca menunjukkan motilitas pasca *thawing* yang tertinggi sebesar 55%. Dari paparan tersebut terlihat bahwa jenis pengencer dan konsentrasi DMSO yang digunakan berbeda-beda, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengkaji karakteristik fisik reproduksi dan kualitas semen lele dumbo, mencari satu jenis pengencer terbaik dan menentukan konsentrasi DMSO yang tepat dalam berbagai pengencer serta menguji fertilitas spermatozoa hasil kriopreservasi semen lele dumbo.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2008 sampai dengan Juni 2009 di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi FKH-IPB.

### Materi Penelitian

Induk ikan yang digunakan pada penelitian ini adalah induk jantan lele dumbo (*C. gariepinus*) sebanyak 20 ekor dengan bobot tubuh 1,0–2,0 kg/ekor dan 5 ekor induk lele dumbo betina untuk uji fertilitas dengan bobot 1,0–1,5 kg/ekor diperoleh dari petani pembudidaya lele dumbo di sekitar Bogor dan Parung.

### Metode Penelitian

#### 1. Persiapan Induk Jantan Lele Dumbo

Induk jantan dan betina lele dumbo yang telah matang gonad dipelihara terpisah pada wadah bak plastik yang dilengkapi dengan aerator air.

#### 2. Kriopreservasi Spermatozoa lele dumbo

Penyiapan bahan pengencer dilakukan secara dua tahap. Yang pertama penyiapan pengencer dasar sebanyak empat macam dengan komposisi seperti yang terlihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi Larutan Pengencer Dasar Lele dumbo

Bahan	Jenis Pengencer			
	1	2	3	4
NaCl (g)	0.75	0.3	0.88	-
KCl (g)	0.02	-	1.12	-
$\text{CaCl}_2$ (g)	0.02	-	-	-
$\text{NaHCO}_3$ (g)	0.02	0.05	-	-
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (g)	-	-	0.36	-
Glukosa (g)	-	6.0	-	-
Fruktosa (g)	-	-	-	6.0
Aquades (mL)	100	100	150	100

Keterangan : P<sub>1</sub> Kurokura *et al.* (1984); P<sub>2</sub> Zhang dan Liu (1991); P<sub>3</sub> Cognie *et al.* (1989) & P<sub>4</sub> Horvath dan Urbanyi (2000).

Tahap kedua, penyiapan pengencer untuk spermatozoa beku yang terdiri atas kombinasi yaitu 16 kombinasi pengencer (4 pengencer X 4 konsentrasi DMSO) (Tabel 2).

**Tabel 2.** Perlakuan komposisi bahan pengencer lele dumbo (*C. gariepinus*) konsentrasi DMSO secara bertingkat

Pengencer	DMSO (%)			
	5	10	15	20
P <sub>1</sub>	P <sub>1</sub> D <sub>5</sub>	P <sub>1</sub> D <sub>10</sub>	P <sub>1</sub> D <sub>15</sub>	P <sub>1</sub> D <sub>20</sub>
P <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> D <sub>5</sub>	P <sub>2</sub> D <sub>10</sub>	P <sub>2</sub> D <sub>15</sub>	P <sub>2</sub> D <sub>20</sub>
P <sub>3</sub>	P <sub>3</sub> D <sub>5</sub>	P <sub>3</sub> D <sub>10</sub>	P <sub>3</sub> D <sub>15</sub>	P <sub>3</sub> D <sub>20</sub>
P <sub>4</sub>	P <sub>4</sub> D <sub>5</sub>	P <sub>4</sub> D <sub>10</sub>	P <sub>4</sub> D <sub>15</sub>	P <sub>4</sub> D <sub>20</sub>

Selanjutnya komposisi bahan pengencer semen beku disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Komposisi bahan pengencer semen beku

Perlakuan	Pengencer Dasar (mL)	DMSO (mL)	Jumlah (mL)
P <sub>1</sub> D <sub>5</sub>	9.5	0.5	10.0
P <sub>1</sub> D <sub>10</sub>	9.0	1.0	10.0
P <sub>1</sub> D <sub>15</sub>	8.5	1.5	10.0
P <sub>1</sub> D <sub>20</sub>	8.0	2.0	10.0
P <sub>2</sub> D <sub>5</sub>	9.5	0.5	10.0
P <sub>2</sub> D <sub>10</sub>	9.0	1.0	10.0
P <sub>2</sub> D <sub>15</sub>	8.5	1.5	10.0
P <sub>2</sub> D <sub>20</sub>	8.0	2.0	10.0
P <sub>3</sub> D <sub>5</sub>	9.5	0.5	10.0

Perlakuan	Pengencer Dasar (mL)	DMSO (mL)	Jumlah (mL)
P <sub>3</sub> D <sub>10</sub>	9.0	1.0	10.0
P <sub>3</sub> D <sub>15</sub>	8.5	1.5	10.0
P <sub>3</sub> D <sub>20</sub>	8.0	2.0	10.0
P <sub>4</sub> D <sub>5</sub>	9.5	0.5	10.0
P <sub>4</sub> D <sub>10</sub>	9.0	1.0	10.0
P <sub>4</sub> D <sub>15</sub>	8.5	1.5	10.0
P <sub>4</sub> D <sub>20</sub>	8.0	2.0	10.0

Spermatozoa diolah secara individual dan hanya spermatozoa yang menunjukkan persentase spermatozoa motil >60% digunakan dalam penelitian ini (Urbanyi *et al.*, 1999). Spermatozoa yang telah diencerkan sesuai perlakuan dengan konsentrasi  $400 \times 10^6$  spermatozoa/ml selanjutnya dikemas ke dalam *straw* minitub (0,3 ml). Selanjutnya *straw* diequilibrasi dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 30 menit (Urbanyi *et al.*, 1999). Pembekuan diatas permukaan nitrogen (N<sub>2</sub>) cair dengan jarak 6,5 cm selama 10 menit. Semen beku disimpan di dalam kontainer (N<sub>2</sub>) cair suhu -196°C untuk dilakukan evaluasi lebih lanjut.

### 1. Evaluasi Spermatozoa Pasca Pembekuan (*Thawing*)

Semen beku di-*thawing* pada air hangat (30 °C) selama 30 detik. Pengamatan persentase motilitas spermatozoa progresif dinilai secara subyektif kuantitatif dari 5 lapang pandang yang berbeda.

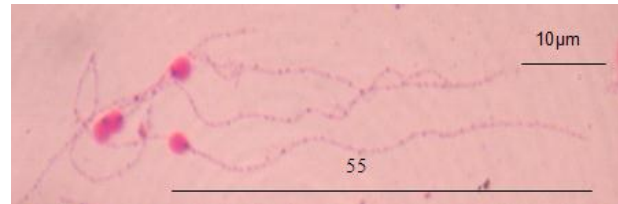
### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan faktorial RAK dua faktorial dengan pola faktorial 4 x 4 (4 jenis pengencer dan 4 konsentrasi DMSO) dengan ulangan 7 kali. Data dianalisis menggunakan sidik ragam (*ANOVA*) searah dengan *SPSS for windows* (Ver.10) (Kinnear & Gray, 2000) dan jika ada perbedaan dilanjutkan uji Duncan (Steel & Torrie, 1995).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi spermatozoa lele dumbo berbeda dengan spermatozoa mamalia. Bentuk kepala lebih bulat dengan ekor yang tipis dan panjang. Dengan menggunakan pewarnaan Williams panjang total

dari kepala sampai dengan ujung ekor  $\pm 55 \mu\text{m}$ . (Gambar 1).

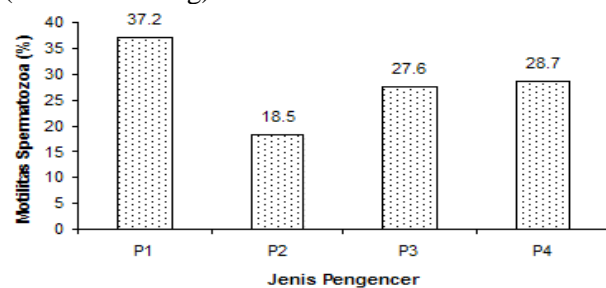


**Gambar 1.** Morfologi spermatozoa lele dumbo menggunakan pewarnaan Williams.

## Kualitas Semen Beku Lele Dumbo

### Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Lele Dumbo

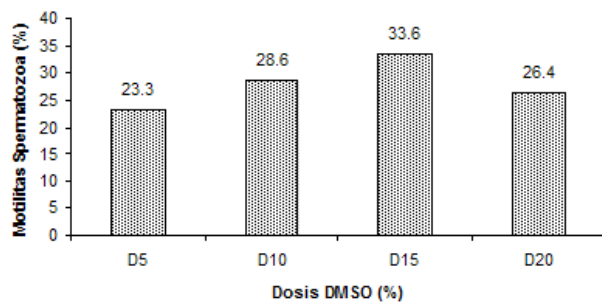
Tanpa memperhitungkan konsentrasi DMSO, antara ke empat pengencer yang digunakan, pengencer P<sub>1</sub> ( $37.2 \pm 5.6$ ) menunjukkan persentase motilitas secara nyata ( $P < 0.05$ ) tertinggi dibandingkan dengan ketiga pengencer lainnya (Gambar 2). Pengencer terbaik berikutnya adalah P<sub>4</sub> ( $28.7 \pm 10.1\%$ ) dan P<sub>3</sub> ( $27.6 \pm 7.3\%$ ) dan tidak ada perbedaan yang nyata di antara keduanya. Motilitas P<sub>2</sub> menunjukkan yang paling rendah yaitu  $18,5 \pm 11,4\%$ . Perbedaan kualitas tersebut kemungkinan disebabkan oleh komposisi kimia pada pengencer P<sub>1</sub> yang lebih lengkap, diantaranya terkandung NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> dan NaHCO<sub>3</sub>. Selain itu hasil pengukuran tekanan osmotik dari P<sub>1</sub> adalah 0,174 Osmol/kg dan ternyata hampir sama dengan tekanan osmotik dari semen segar lele dumbo sebesar 0,170 Osmol/kg. Tiga pengencer lainnya menunjukkan tekanan osmotik yang lebih tinggi (hiperosmotik) yaitu P<sub>4</sub> (0,272 Osmol/kg) dan P<sub>3</sub> (0,323 Osmol/kg), sedangkan P<sub>2</sub> menunjukkan tekanan osmotik yang paling tinggi (0,375 Osmol/kg).



**Gambar 2.** Motilitas spermatozoa pasca *thawing* lele dumbo pada berbagai bahan pengencer.

**Pengaruh Konsentrasi DMSO Terhadap Kualitas Semen Beku Lele Dumbo**

Tanpa memperhitungkan jenis pengencer yang digunakan konsentrasi DMSO 15% ( $33,6 \pm 7,0$ ) menunjukkan persentase motilitas yang signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan ketiga konsentrasi DMSO lainnya. Konsentrasi DMSO 10% dan 20% menunjukkan persentase motilitas terbaik kedua dengan persentase motilitas masing-masing adalah  $28,6 \pm 8,4\%$  dan  $26,4 \pm 10,1\%$ , tidak ada perbedaan yang nyata diantara keduanya. Dosis DMSO 5% menunjukkan motilitas spermatozoa yang paling rendah yaitu  $23,3 \pm 8,9\%$ .



**Gambar 3.** Motilitas spermatozoa pasca *thawing* lele dumbo pada berbagai konsentrasi DMSO

Konsentrasi DMSO 15% paling baik dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Hal ini kemungkinan konsentrasi tersebut yang paling baik dalam melindungi spermatozoa selama pembekuan. Konsentrasi DMSO 20% kemungkinan terlalu tinggi sehingga menyebabkan terjadinya toksisitas. Sebaiknya konsentrasi 5% dan 10% kemungkinan terlalu rendah sehingga tidak terlalu optimal dalam melindungi spermatozoa pada saat pembekuan. Konsentrasi 15% DMSO yang digunakan sama dengan yang dilaporkan oleh Akcay *et al.* (2004) bahwa dengan penggunaan DMSO 15% menghasilkan persentase motilitas spermatozoa pasca *thawing* yang tertinggi sebesar 55% pada ikan mas kaca. Selanjutnya ditambahkan oleh Melo dan Godinho (2006) bahwa penggunaan krioprotektan DMSO sebanyak 15% pada semen ikan *Brycon orthotaenia* menghasilkan motilitas pasca *thawing* sebesar  $83,3 \pm 19,1\%$ .

**Pengaruh Interaksi Jenis Pengencer dan Konsentrasi DMSO Terhadap Kualitas Semen Beku Lele Dumbo**

Kualitas semen beku dinilai sebanyak tiga *straw* untuk setiap perlakuan. Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan diperoleh persentase motilitas semen beku lele dumbo tertinggi pada perlakuan  $P_1D_{15}$  ( $45,7 \pm 4,3$ ) dan persentase motilitas terendah diperoleh pada perlakuan  $P_2D_{20}$  ( $14,5 \pm 13,2$ ) (Tabel 5).

**Tabel 5.** Rataan persentase kualitas semen beku lele dumbo pada beberapa jenis pengencer dan konsentrasi DMSO

Pengencer	Dosis DMSO (%)	Kode	Motilitas Spermatozoa (%)
1	5	$P_1D_5$	$31.7 \pm 7.1^{bc}$
	10	$P_1D_{10}$	$37.4 \pm 4.8^b$
	15	$P_1D_{15}$	<b><math>45.7 \pm 4.3^a</math></b>
	20	$P_1D_{20}$	$34.1 \pm 6.4^b$
2	5	$P_2D_5$	$20.0 \pm 11.0^{efg}$
	10	$P_2D_{10}$	$18.8 \pm 11.5^{fg}$
	15	$P_2D_{15}$	$20.5 \pm 9.9^{efg}$
	20	$P_2D_{20}$	$14.5 \pm 13.2^g$
3	5	$P_3D_5$	$17.1 \pm 8.3^g$
	10	$P_3D_{10}$	$26.9 \pm 8.6^{cd}$
	15	$P_3D_{15}$	$34.5 \pm 5.3^b$
	20	$P_3D_{20}$	$31.7 \pm 7.0^{bc}$
4	5	$P_4D_5$	$24.3 \pm 9.4^{def}$
	10	$P_4D_{10}$	$31.4 \pm 8.6^{bc}$
	15	$P_4D_{15}$	$33.8 \pm 8.8^b$
	20	$P_4D_{20}$	$25.2 \pm 13.9^{de}$

Keterangan : Huruf berbeda yang mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0.05$ ).

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan terlihat bahwa dari uji statistik diketahui bahwa terdapat interaksi antara pengencer dengan konsentrasi memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa lele dumbo. Hal ini disebabkan jenis pengencer yang digunakan memiliki komposisi bahan-bahan yang berbeda antar pengencer dan demikian pula untuk konsentrasi yang digunakan berbeda antara perlakuan. Menurut Urbanyi *et al.* (1999) bahwa bahan pengencer yang mengandung  $NaHCO_3$  paling sesuai untuk ditambahkan ke dalam

pengencer semen beku lele dumbo yang memiliki kemampuan sistem *buffer* terhadap kondisi perubahan pH semen beku lele dumbo dibandingkan Tris (hydroxymethyl) aminomethan. Sedangkan konsentrasi juga memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa semen beku untuk melindungi sperma dari bahaya kerusakan pada saat kriopreservasi. Jadi dalam penggunaan bahan pengencer harus disesuaikan jenisnya dan konsentrasi yang akan digunakan untuk mendapatkan persentase motilitas spermatozoa pasca *thawing* yang baik.

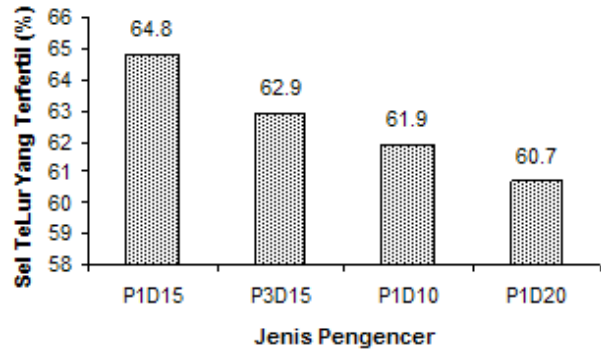
### Tingkat Fertilitas Semen Beku Lele dumbo

Selama kegiatan uji fertilitas parameter kualitas air yang diukur dalam kondisi yang optimal untuk keberlangsungan inkubasi telur lele dumbo. Parameter yang diukur yaitu suhu berkisar 27-29 °C, pH airnya berkisar antara 6,9 – 7,0 dan kelarutan oksigen terlarut berkisar 5,0–5,3 ppm. Hal ini sesuai dengan pendapat Sahoo *et al.* (2005) bahwa parameter kualitas air yang digunakan untuk mendukung keberlangsungan inkubasi telur dengan suhu 27-28,5 °C, pH 6,8-7,5 dan oksigen terlarut berkisar 5,8-6,7 ppm.

Induk betina lele dumbo yang dipersiapkan sebanyak lima ekor, namun setelah dilakukan pengamatan kualitas sel telur ternyata hanya empat ekor saja yang layak digunakan untuk uji fertilitas. Induk lele dumbo betina yang digunakan sebagai sumber sel telur memiliki berat tubuh  $0,8 \pm 0,1$  kg dengan jumlah sel telur per takar sendok buah/koktail kecil yang digunakan untuk uji fertilitas sebanyak  $698,7 \pm 61,7$  butir.

Dari 16 kombinasi pengencer yang telah diuji motilitasnya, hanya empat kombinasi pengencer yang menunjukkan nilai persentase motilitas spermatozoa tertinggi ( $\geq 34,1 \pm 6,4$ ) yang digunakan pada uji fertilitas yaitu  $P_1D_{15}$ ;  $P_3D_{15}$ ;  $P_1D_{10}$ ;  $P_1D_{20}$ .

Berdasarkan hasil pengamatan 12 jam setelah dilakukan penyatuan sel gamet ternyata tidak ada perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) antara ke empat pengencer yang digunakan dalam penelitian. Dengan persentase masing-masing adalah  $64,8 \pm 3,7$ ;  $62,89$ ;  $61,89$ ;  $60,7 \pm 2,2$  untuk pengencer  $P_1D_{15}$ ;  $P_3D_{15}$ ;  $P_1D_{10}$  dan  $P_1D_{20}$ .



**Gambar 4.** Fertilitas sel telur lele dumbo menggunakan semen beku.

Dari hasil di atas terlihat bahwa ke empat jenis pengencer yang diujikan bisa digunakan untuk kegiatan fertilisasi sel telur, namun sebaiknya menggunakan jenis pengencer  $P_1D_{15}$  yang menunjukkan hasil persentase fertilitas sel telur lele dumbo sebesar  $64,8 \pm 3,7$ . Hasil tersebut hampir sama dengan yang diamati oleh Horvath dan Urbanyi (2000) yang memperoleh nilai fertilitas pada sel telur lele dumbo sebesar  $67,1 \pm 11,9\%$  dengan menggunakan teknik fertilisasi basah.

Dari seluruh rangkaian penelitian ini dapat dilakukan teknik kriopreservasi semen dengan menggunakan jenis pengencer  $P_1$  yang memiliki komposisi NaCl, KCl,  $CaCl_2$  dan  $NaHCO_3$  dikombinasikan dengan krioprotektan DMSO sebanyak 15% pada semen beku lele dumbo.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini yaitu jenis pengencer yang terbaik adalah pengencer  $P_1$  yang memiliki komposisi NaCl, KCl,  $CaCl_2$  dan  $NaHCO_3$  serta dosis krioprotektan DMSO yang terbaik adalah 15%. Sedangkan jenis perlakuan yang terbaik adalah perlakuan  $P_1D_{15}$ .

### Saran

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan mengenai pemeliharaan kualitas benih lele dumbo yang dihasilkan dengan menggunakan semen beku, guna keberhasilan peningkatan produksi benih lele dumbo.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Akcaý E., B. Yusuf, S. Selcuk and T. Necmettin. 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turk J Vet Anim Sci.* 28:837–843p.
- Cognie F., R. Billard, and N.H. Chao. 1989. Freezing of the Milt of the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol.* 5:165–176p.
- Horvath A. and B. Urbanyi. 2000. The Effect of Cryoprotectants on the Motility and Fertilizing Capacity of Cryopreserved African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) Sperm. *Aquaculture Research.* 31:317–324p.
- Kinnear P.R. and C.D. Gray. 2000. SPSS for Windows Made Simple. Release 10. Departement of Psychology, University of Aberdeen, *Psychology Press*, UK.
- Kurokura H., R. Hirano, M. Tomita, M. Iwahashi. 1984. Cryopreservation of Carp Sperm. *Aquaculture.* 37:267–273p.
- Kwantong S. and Amrit N. Bart. 2003. Effect of Cryoprotectants, Extender and Freezing rates on the Fertilization rate of frozen Striped Catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), Sperm. *Aquaculture Research,* 34:887–893p.
- Mansour N., Adel Ramoun and Franz Lahnsteiner. 2005. Quality of Testicular Semen of the African Catfish (Burchell, 1822) and Its Relationship with Fertilization and Hatching Success. *Aquaculture Research,* 36:1422-1428p.
- Melo F.C.S.A., and H.P. Godinho. 2006. A Protocol for Cryopreservation of Spermatozoa of the Fish *Brycon orthotaenia*. *Animal Reproduction,* v3. n3:380-385p.
- Pusat Data Statistik dan Informasi. 2006. Statistik Kelautan dan Perikanan Tahun 2005. Departemen Kelautan dan Perikanan. Sekretariat Jenderal Pusat Data, Statistik dan Informasi. Jakarta.
- Sahoo S.K., S.S. Giri and A.K. Sahu. 2005. Effect on Breeding Performance and Egg Quality of *Clarias batrachus* (Linn.) at Various Doses of Ovotide During Spawning Induction. *Asian Fisheries Science.* 18:77-83p.
- Steel R.G.D. and J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. B. Sumantri, Penerjemah : Jakarta. Gramedia.
- Urbanyi B, A. Horvath and L. Horvath. 1999. Effect of Extenders on Sperm Cryopreservation of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Research.* 30:145–151p.
- Zhang X., Liu Y. 1991. Study of Cryopreservation of Fish Spermatozoa. 1. Methods of Freezing and Thawing. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis.* 15:59–63p.