Cannarium (Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian) **Volume 20 Number 1**
P-ISSN: 1693–1491 . E-ISSN:2774-5201 Juni 2022

Pengaruh Waktu Sentrifugasi pada *Sexing* Spermatozoa dengan Media *Bovine Serum Albumin* (BSA) Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa X-Y Sapi Simmental

Langgeng Priyanto[1,*], Riswandi[1], Eva Setianingsih[1], Oktora Dwi Putranti[2], Muhammad Gunawan[3], Apriansyah Susanda[4]

[1]*Fakultas Pertanian, Prodi Peternakan University of Sriwijaya, Sumatera Selatan 30862. E-mail address: priyantolanggeng@gmail.com. Telp. 082120026397*
[2]*Fakultas Pertanian, Prodi Peternakan. Universitas Khairun. Ternate. Maluku Utara. Email: oktora.unkhair@gmail.com. Telp: 082300019964*
[3]*Pusat Riset Bioteknologi, Organisasi Riset Ilmu Pengetahuan Hayati, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong Kab. Bogor. Email: muhammadgunawan1976@gmail.com*
[4]*Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. Jawa Timur. Email: cheesyan@gmail.com. Telp. 08127363595*
[*]*Corresponding author. Email: oktora.unkhair@gmail.com*

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of centrifugation time on sexing spermatozoa with Bovine Serum Albumin (BSA) media on the motility and viability of spermatozoa X-Y Simmental cow. This research was carried out from October to November 2021 at the Sembawa Banyuasin Animal Feed Breeding Center, South Sumatra and the Animal Reproduction and Health Laboratory. The study was conducted using Simmental type cow semen aged 3 years. This study used 3 treatments with 4 repetitions. The variables observed were the motility and viability of the Simmental cattle spermatozoa. Data were analyzed using ANOVA and Duncan's test 5%. The results showed that the with a centrifugation time of 4 minutes(P1) with a speed of 1500 rpm got the best results for the motility value of spermatozoa X = 61.54% and spermatozoa Y = 56.71%, the best value of spermatozoa viability X = 66.17 and spermatozoa viability Y = 62, 46%. It can be concluded that the longer the centrifugation time affects the quality of the spermatozoa which results in a decrease in the motility and viability of the spermatozoa X-Y of Simmental Cow.

Keywords: Sexing, Bovine Serum Albumin, Centrifugation, Motility and viability

I. PENDAHULUAN

Sapi Simmental di Indonesia dapat dijadikan sebagai sapi potong dan perah karena selain memiliki daging yang banyak juga dapat dijadikan sebagai indukan yang dapat dimanfaatkan susunya. Kualitas semen dari pejantan unggul berperan penting dalam inseminasi buatan, hal ini dikarenakan faktor keberhasilan dari teknologi IB. Upaya untuk meningkatkan kualitas sapi Simmental perlu dilakukan, salah satunya dengan meningkatkan mutu genetik dan populasinya. Penentuan jenis kelamin pedet memiliki peran penting untuk memperoleh bibit, jenis dan genetik yang baik. Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efesiensi usaha peternakan. Metode pemisahan jenis kelamin spermatozoa (*sexing*) menggunakan media *Bovine Serum Albumin* (BSA) pada konsentrasi 5 gr / 500 ml berhasil memisahkan spermatozoa pembawa kromosom X menghasilkan pedet sapi perah betina untuk memproduksi susu sebagai *replecement* induk superior (Taylor, 2005) dan kromosom Y yang akan menghasilkan pedet sapi potong jantan bakalan untuk penggemukan (Said *et al.*, 2005).

Pengembangan metode pemisahan jenis kelamin spermatozoa sapi yang telah dilakukan di Puslit Bioteknologi LIPI adalah dengan menggunakan kolom BSA 5-10% (Kaiin *et al.*, 2007). Metode pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi dilakukan dengn cara memutar sperma di dalam tabung yang berisi medium isotonis dengan kecepatan dan waktu tertentu (Hafez, 2000). Berdasarkan hal tersebut, timbul inisiatif untuk meneliti serta mempelajari pengaruh waktu sentrifugasi semen hasil *sexing* dengan media *Bovine Serum Albumin* terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa X-Y sapi Simmental.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Inseminasi Pembibitan Hijauan Pakan Ternak (BPHPT) Sembawa Banyuasin Provinsi Sumatera Selatan tepatnya di Laboratorium Reproduksi dan Kesehatan Ternak

BPHPT Sembawa pada bulan Oktober sampai dengan November 2021.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dengan 4 kali ulangan pada setiap perlakuan. Perlakuan ini adalah lama sentrifugasi (menit waktu) yang terdiri dari P1 (4), P2 (8) dan P3 (12). Tiap perlakuan sentrifugasi, masing-masing dilakukan dengan kecepatan 1500 rpm.

Penampungan Semen

Semen yang digunakan sebagai sampel adalah jenis sapi Simmental, umur 3 tahun 10 bulan. Sebelum melakukan penampungan semen, sapi terlebih dahulu dibersihkan dengan cara dimandikan. Penampungan semen dilakukan dengan vagina buatan. Sapi jantan yang digunakan sebagai pemacing (*teaser*) dimasukkan ke dalam kandang jepit, untuk meningkatkan libido, semen dari ejakulasi ketiga yang tertampung diambil dan segera dievaluasi secara
makroskopis dan mikroskopis (Sunarti *et al*., 2016).

Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Pergerakan spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa untuk melakukan gerak maju atau progresif. Analisis dengan cara mengambil sedikit semen kemudian letakkan semen di atas object glass dan ditutup dengan cover glass serta diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400X, dilihat yang bergerak progresif kedepan (pergerakan mundur dan melingkar tidak diikut sertakan) dibandingkan dengan spermatozoa yang diam di tempat (Susilowati *et al*., 2010).

Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas dilihat dengan membuat ulasan eosin-negrosin, kemudian dihitung dalam bentuk persentase antara spermatozoa yang hidup dan yang mati.

$$\text{Persentase Hidup (\%)} = \frac{Jumlah\ spermatoa\ yang\ hidup}{Jumlah\ spermatozoa\ yang\ dihitung} \times 100\%$$

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisa dengan uji lanjut Duncant's Multi Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1993).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Nilai Rataan Motilitas Spermatozoa X-Y Sapi Simmental

Motilitas salah satu indikator yang menunjukkan kualitas sperma bergerak secara progresif untuk membuahi sel telur (Sarastina *et al*., 2012). Motilitas spermatozoa setelah sentrifugasi dapat dilihat pada Tabel .1.

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukan bahwa waktu sentrifugasi pada sexing spermatozoa dengan media *Bovine Serum Albumin* (BSA) berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap motilitas spermatozoa pada lapisan atas (X). Hasil dari uji lanjut *Duncan Multi Range Test* (DMRT) pada lapisan atas menunjukan bahwa semua perlakuan berbeda nyata terhadap nilai motilitas spermatozoa, dimana pada lapisan atas P1 berbeda nyata dibandingkan dengan P2 dan P3, dan P2 berbeda nyata dengan P3.

Tabel 1. Nila Rata-rata Motilitas Spermatozoa X-Y *Sexing* Sentrifugasi

Motilitas Spermatozoa	Perlakuan		
	P1	P2	P3
Lapisan atas (X)	$61{,}54^{a}$ ±1,85	$59{,}32^{b}$ ±1,71	$57{,}82^{c}$± 1,66
Lapisan bawah (Y)	56,71 ± 4,23	50,72 ± 7,81	45,93 ± 5,56

Keterangan: Angka-angka yang di ikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukan tidak berbeda nyata pada taraf 5% (P < 0,05). P1 = waktu sentrifugasi 4 menit, P2= waktu sentrifugasi 8 menit, P3= waktu sentrifugasi 12 menit.

Motilitas spermatozoa lapisan atas (X) pada P3 mengalami penurunan sebesar 6,04% dibandingkan dengan P1 dan mengalami penurunan kembali sebesar 3,60% dibandingkan dengan P2, sedangkan pada P2 mengalami penurunan motilitas sebesar 2,52% dibandingkan dengan P1. Berbeda dengan waktu sentrifugasi pada sexing spermatozoa tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap motilitas spermatozoa pada lapisan bawah (Y). Hasil pengamatan motilitas spermatozoa lapisan bawah (Y) setelah sentrifugasi dapat dilihat pada tabel 4.1. Nilai persetase motilitas pada lapisan bawah (Y) juga mengalami penurunan, pada P3 menurun sebesar 19,00% dibandingkan dengan P1 dan mengalami penurunan kembali sebesar 10,56% dibandingkan dengan P2, sedangkan P2 mengalami penurunan motilitas sebesar 9,44% dibandingkan dengan P1.

Nilai motilitas tertinggi pada lapisan atas maupun bawah terdapat pada P1, hal ini diduga karena waktu sentrifugasi 4 menit lebih baik dari pada waktu sentrifugasi 8 maupun 12 menit. Diduga penurunan motilitas spermatozoa disebabkan oleh perbedaan dari masing-masing perlakuan yaitu lamanya waktu sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm. Hal ini sejalan dengan pendapat Trilas, (2003) menyatakan bahwa kecepatan dan lama waktu sentrifugasi dapat mempengaruhi membran plasma utuh spermatozoa yang berkorelasi dengan motilitas spermatozoa. Persentase motilitas semen yang dihasilkan pada penelitian ini tergolong baik, sebagaimana yang disampaikan oleh Toelihere (1993) yang menyetakan bahwa persentase motilitas spermatozoa di bawah 40% menunjukkan semen yang kurang baik dan berkaitan erat dengan infertilitas. *Sexing* dengan media BSA pada lapisan atas 5% dan lapisan bawah 10% dimana menurut Solihati *et al*. (2020) penggunaan BSA 5% memiliki pH 7,4, densitas sebesar 1,0547 g/ml, dan viskositas 0,8648 cP, sedangkan BSA 10% memiliki pH 7,40, densitas sebesar 1,0661 g/ml dan viskositas 1,0378 cP. pH normal berpengaruh terhadap aktivitas mitokondria, karena enzim-enzim pada mitokondria akan aktif pada pH yang normal sehingga motilitas spermatozoa X-Y aktif bergerak. BSA 5% yang memiliki densitas dan viskositas yang lebih kecil dari BSA 10% mengakibatkan spermatozoa Y berpindah ke

bawah, menembus BSA yang lebih besar yaitu 10% dan spermatozoa X tertahan di lapisan atas. Spermatozoa X mengandung kromatin yang lebih banyak pada bagian kepala yang mengakibatkan ukuran dan berat kepala spermatozoa X lebih besar dibandingkan spermatozoa Y, dari perbedaan ini mengakibatkan motilitas spermatozoa X lebih lambat dari pada spermatozoa Y (Check *et al*., 1998). Spermatozoa Y memiliki ukuran kepala yang lebih kecil dan mempunyai kecepatan bergerak lebih tinggi dari pada spermatozoa X, sehingga lebih mampu bergerak untuk menembus lapisan bawah yang konsentrasinya lebih tinggi (Afiati, 2004). Densitas dan osmosis pada sexing menggunsksn media BSA mempunyai korelasi, yaitu terdapat pada konsentrasinya, hal ini dikarenakan penggunaan BSA 10% pada lapisan bawah memiliki densitas yang lebih besar dibandingkan BSA 5% pada lapisan atas. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi BSA, maka semakin banyak molekul yang terkandung di dalamnya, sehingga mengakibatkan nilai densitas semakin besar. BSA 10% pada lapisan bawah memiliki konsentrasi yang lebih tinggi sehingga menyebabkan osmolaritas sel dari spermatozoa menjadi tinggi dan menghasilkan dan menghasilkan larutan berubah menjadi hipertonik (Gadea, 2003).

BSA sebagian besar dapat mencegah terjadinya efek pengenceran yang telah diasumsikan protein yang terkandung didalamnya dapat menggantikan komponen plasma mani vital. Efek pengenceran merupakan suatu proses terjadinya penurunan nilai motilitas secara cepat dan peningkatan proporsi kematian spermatozoa ketika semen diencerkan dengan media buatan. Albumin tidak bertindak sebagai pelindung, akan tetapi merangsang motilitas suspensi spermatozoa encer secara reversibel. Perlindungan yang diberikn oleh serum albumin terhadap efek pengenceran yaitu kemampuannya untuk merangsang motilitas dan mencegah terjadinya penempelan spermatozoa pada permukaan wadah atau tabung yang dapat berpotensi merusak spermatozoa dan merobek plasma smen (Solihati *et al*., 2020).

Gambar 1. Motilitas spermatozoa dengan perbesaran 400X (Sumber: Hasil foto penelitian di BPHPT Sembawa 2021)

2. Nilai Rataan Viabilitas Spermatozoa X-Y Sapi Simmental

Pengamatan viabilitas bertujuan untuk menghitung besarnya persentase spermatozoa yang hidup dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup dan mati dibedakan reaksinya terhadap warna tertentu, sel spermatozoa yang mati menghisap warna dan sel spermatozoa yang hidup tidak berwarna (Susilawati, 2011). Viabilitas spermatozoa setelah sentrifugasidapat dilihat pada Tabel .2

Tabel 2. Nilai Rataan Viabilitas Spermatozoa X-Y *Sexing* Sentrifugasi

Viabilitas Spermatozoa	Perlakuan		
	P1	P2	P3
Lapisan atas (X)	$66,17^{a} \pm 1,81$	$63,66^{b} \pm 2,30$	$60,99^{c} \pm 2,28$
Lapisan bawah (Y)	$62,46^{a} \pm 2,25$	$58,66^{b} \pm 3,41$	$55,02^{c} \pm 2,95$

Keterangan: Angka-angka yang di ikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukan tidak berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$). P1 = waktu sentrifugasi 4 menit, P2= waktu sentrifugasi 8 menit, P3= waktu sentrifugasi 12 menit.

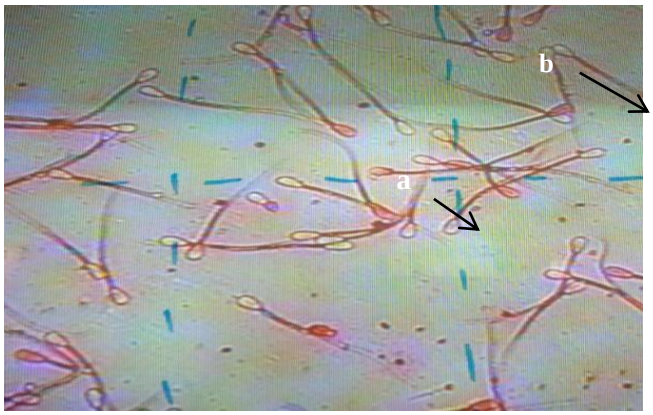
Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukan bahwa waktu sentrifugasi pada sexing spermatozoa dengan media *Bovine Serum Albumin* (BSA) berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa baik pada lapisan atas (X) maupun lapisan bawah (Y). Hasil dari uji lanjut *Duncan Multi Range Test* (DMRT) pada lapisan atas menunjukan bahwa perlakuan P1, P2 dan P3 berbeda nyata terhadap nilai viabilitas spermatozoa, dimana pada lapisan atas P1 berbeda nyata dibandingkan dengan P2 dan P3, dan P2 berbeda nyata dengan P3.

Viabilitas spermatozoa (X) pada P3 mengalami penurunan sebesar 7,82% dibandingkan dengan P1 dan mengalami penurunan kembali sebesar 3,79% dibandingkan dengan P2, sedangkan pada P2 mengalami penurunan viabilitas sebesar 4,19% dibandingkan dengan P1. Berbeda dengan waktu sentrifugasi pada sexing spermatozoa terhadap viabilitas spermatozoa pada lapisan bawah (Y) juga mengalami penurunan. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa (Y) setelah sentrifugasi dapat dilihat pada tabel .2. Hasil dari uji lanjut *Duncan Multi Range Test* (DMRT) pada lapisan bawah (Y) menunjukan bahwa perlakuan P1, P2 dan P3 berbeda nyata terhadap nilai viabilitas spermatozoa, dimana pada P1 berbeda nyata dibandingkan dengan P2 dan P3, dan P2 berbeda nyata dengan P3. Nilai persetase viabilitas pada lapisan bawah (Y) juga mengalami penurunan, pada P3 menurun sebesar 11,91% dibandingkan dengan P1 dan mengalami penurunan kembali sebesar 6,08% dibandingkan dengan P2, sedangkan P2 mengalami penurunan viabilitas sebesar 6,20% dibandingkan dengan P1.

Persentase viabilitas yang dihasilkan pada penelitian ini tergolong masih baik, hal ini sejalan dengan pendapat Lopes (2002) yang menyatakan bahwa viabilitas semen masih dianggap baik apabila memiliki

kisaran nilai antara 50-69%. Hasil pengamatan persentase viabilitas spermatozoa setelah sentrifugasi mengalami penurunan baik lapisan atas maupun lapisan bawah dilihat pada tabel 2. Pemisahan spermatozoa menggunkan media sentrifugasi mengakibatkan kerusakan struktur membran spermatozoa mengakibatkan terganggunya proses metabolisme sehingga spermatozoa menjadi lemah (Susilawati, 2003) dan menyebabkan penyerapan warna pada saat uji warna eosin-negrosin (Maxwell dan Watson, 1996).

Data pada Tabel 2 menunjukkan hasil pengamatan viabilitas dengan lama sentrifugasi 4 menit (P1) pada lapisan atas maupun lapisan bawah memiliki persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan waktu sentrifugasi 8 (P2) dan 12 menit (P3). Hal ini dikarenakan semakin lama waktu sentrifugasi maka persentase viabilitas akan semakin menurun karena terjadinya pergesekan antara spermatozoa dengan medium sexing dan spermatozoa yang lain sehingga berdampak pada kerusakan membran sel (Mahfud *et al*. 2019 dan berakibat terputusnya kepala dan ekor spermatozoa (Susilawati, 2014), juga dapat mempengaruhi tingkat produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri dari kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal, senyawa oksigen reaktif ini dihasilkan dalam proses metabolisme oksidatif dalam tubuh, misalnya pada proses perubahan 2 molekul glukosa menjadi 36 ATP secara aerob dan anaerob (Murray, R. K. (2009).



Gambar 2. Viabilitas spermtozoa dengan perbesaran 400X (Sumber: hasil foto penelitian di BPHPT Sembawa 2021). Keterangan: a= spermatozo yang hidup b= spermatozoa yang mati

IV. KESIMPULAN

Perlakuan lama waktu sentrifugasi pada *sexing* spermatozoa dengan media *Bovine Serum Albumin* dapat menurunkan nilai motilitas dan viabilitas spermatozoa X-Y Sapi Simmental. Nilai motilitas dan viabilitas spermatozoa baik lapisan atas maupun lapisan bawah terdapat pada P1, yaitu lama waktu sentrifugasi 4 menit dengan kecepatan 1500 rpm dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa yang mengakibatkan penurunan pada nilai motilitas dan viabilitas spermatozoa X-Y Sapi Simmental.

REFERENSI

Afiati, F. (2004). Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. Media Peternakan 27 (1): 16-20.

Agarwal, Ashok and Zini, Armand. (2014). Spermatogenesis an Over. Reseacrh Gate.

Check, J.H., Shanis, B.S., Cooper, S.O. dan Bollendorf, A., (1998). Male Sex Preselection: Swim Up Technicque And Insemination Of Women After Ovulation Induction. Journal Architect Andrology. 23(2): 165-166.

Feradis. (2010). Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak. Alfabeta. Bandung.

Firdaus, A., T. Susilawati, M. Nasich, dan Kuswati. (2012). Pertambahan Bobot Badan Harian Sapi Brahman Cross Pada Bobot Badan dan Frame Size yang Berbeda. Jurnal Ternak Tropika, 13(1):48-62.

Gadea J. (2003). Pig Industry-Semen Extenders Used In The Artificial Insemination Of Swine. A review. Spanish J. Agric. Res. 1(27): 17-27.

Hafez B, Hafez ESE. (2000). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. pp 431-442.

Kaiin EM, Gunawan M, Tappa B. (2007). Aplikasi IB Dengan Sperma Hasil Pemisahan Di Sumatera Barat. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.

Mahfud, A., N. Isnaini, A.P.A. Yeksi, Kuswati, dan Susilawati, T. (2019). Kualitas Spermatozoa Post Thawing Semen Beku Sperma Y Hasil Sexing Pada Sapi Limousin. Jurnal Ternak Tropika. 20(1) : 1-7.

Maxwell, W.M.C and P.F. Watson. (1996). Recent Progress In The Preservation Of Ram Semen. Anim. Reprod. Sci., 42: 55–65.

Murray, R.K. Granner, D.K., dan Rodwell, V.W. (2009). Biokimia Happer. (27 ed). Jakarta Kedokteran EGC.

Nuraini, A., M.A. Setiadi, dan Ni Wayan K.K. (2016). Kemampuan Fertilisasi Spermatozoa Sexing dan Perkembangan Awal Embrio Secara In Vitro pada Sapi. Jurnal Sain Veteriner. 34(2) :225-232.

Said S, Kaiin. EM, Tappa. B. (2005). Produksi Anak Sapi Potong Dan Sapi Perah Berjenis Kelamin Sesuai Harapan. Prosiding Seminar Nasional Industri Peternakan Modern II. Puslit Bioteknologi LIPI, Mataram.

Solihati, N., Rasad, S.D., Yusrina, A., and Dimyati, D.I. (2017). Identifikasi Morfometrik Sperma Domba Lokal Sebagai Dasar Aplikasi Sexing Sperma. Jurnal Ilmu Ternak, Volume 17, No. 2, 112.

Solihati N., Rasad S. D., Hilmia N., Winangun K., Toha, dan Zule O. V. (2020). Characteristic Several Level Of Bovine Serum Albumin (BSA) And Its Combination As Albumin Column For Sperm Sexing. Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. 386-394.

Sarastina, T. Susilawati dan G. Ciptadi. (2012). Analisis Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa Pada Berbagai Ternak Menggunakan Computer Assisted Semen Analysis (CASA). Jurnal Ternak Tropika, 6(2):1-12.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. (1993). Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. Penerjemah: Sumantri, B. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Sunarti., Saili T. dan Nafiu, L.O. (2016). Karakteristik Spermatozoa Sapi Bali Setelah Sexing Menggunakan Metode Kolom Albumin Dengan Lama Waktu Sexing Yang Berbeda. *JITRO*, 1 (1): 65-75.

Susilawati, T. (2003). Perubahan Fungsi Membran Spermatozoa Sapi pada Proses Seleksi Jenis Kelamin Menggunakan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. Jurnal Widya Agrika, 11(1) : 27-33.

Susilawati, T. (2011). Spermatology. Universitas Brawijaya Press Malang, ISBN: 978-602-8960-04-5.

Susilawati, T. (2014). Sexing Spermatozoa. Hasil Penelitian Laboratorium Dan Aplikasi Pada Sapi dan Kambing. UB Press. Malang.

Susilowati, S., Hardijanto., Suprayogi, T. W., Sarjito, T., & Hernawati, T. (2010). Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Taylor,T.M. (2005). Comparing Calf Sex Ratio And Semen Sex Ratio Determined By Conventional PCR. Thesis. The Interdepartmental Program In Animal and Diary Sciences. Southern Arkansas University, Arkansas.Theriogenoogy 52:1273-1280.

Toelihere, M.R. (1993). *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Angkasa. Bandung.

Trilas, S. (2003). Pengaruh Sentrifugasi Spermatozoa Sapi Terhadap Integritas Membran, Resistensi Dan Kelayakan Kondisi Pada Proses Kapasitas In Vitro. Disertasi, Universitas Airlangga