

PERBEDAAN KUALITAS SPERMATOZOA SEXING SAPI SIMENTAL METODE BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) DARI DUA MACAM PENGENCER

Differences in the Quality of Spermatozoa Sexing Simental Cows Bovine Serum Albumin (BSA) Method From Two Kinds of Diluents

**Indah Agustina Ekowati^{1*}, Arum Setiawan¹, Arfan Abrar², Muhammad Gunawan³,
Oktora Dwi Putranti⁴**

¹Pascasarjana Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, Jalan Padang Selasa 524, Palembang, Sumatera Selatan

²Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Jalan Palembang Prabumulih km. 32, Indralaya, Sumatera Selatan, 30862

³Pusat Penelitian Peternakan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong Science Center, Jalan Raya Jakarta-Bogor, Bogor

⁴Fakultas Pertanian, Prodi Peternakan. Universitas Khairun. Ternate. Maluku Utara.

*Corresponding author, Email : azzahroindahagustina@gmail.com

Received : 4 Februari 2023
Accepted : 25 Mei 2023
Available online : 26 Mei 2023

ABSTRACT

This study aims to determine the quality of frozen semen sexing using Tris Yolk (TKT) and Bovifree (BF) diluent. In this study fresh semen samples were used in healthy male Simental cattle, aged 4 years. After collecting the semen, macroscopically and microscopically check the quality of the fresh semen and then carry out the sexing process. In the next stage, the results of sexing semen were obtained in the upper and lower columns, each of which was further divided into two groups. In group 1 (P1), the cement was diluted with TKT diluent and in group 2 (P2), the cement was diluted with BF diluent. Each treatment with 4 repetitions. Parameters of spermatozoa quality that were measured were the percentage of motility, viability and abnormality. The data obtained was analyzed statistically using the paired two sample t test which was tested with the SPSS 16 for Windows and Microsoft Excel software programs. The results showed that the percentage of spermatozoa motility in the P1 and P2 groups were ; 26.9%; and 38.7%. The viability percentage of spermatozoa in groups P1 and P2 were 55.65% and 40.9%, respectively. The percentage of P1 and P2 abnormalities were 5.88% and 7.06%, respectively. The results of this study indicated that there were differences in the motility, viability and abnormalities of Simmental frozen semen resulting from sexing.

Keywords: Bovifree, Frozen Cement Sexing, Tris Egg Yolk,

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui kualitas semen beku sexing menggunakan pengencer Tris Kuning Telur (TKT) dan Bovifree (BF). Dalam penelitian ini digunakan sampel semen segar sapi Simental jantan sehat, berumur 4 tahun. Setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas semen segar secara makroskopis dan mikroskopis. Kemudian dilakukan tahapan proses *sexing*. Selanjutnya diperoleh semen hasil *sexing* pada kolom atas dan kolom bawah yang masing masing dibagi lagi menjadi dua kelompok. Pada kelompok 1 (P1), dilakukan pengenceran semen dengan pengencer TKT. Pada kelompok 2 (P2), dilakukan pengenceran semen dengan pengencer BF. Penelitian dilakukan ulangan sebanyak 4 kali. Parameter kualitas spermatozoa yang diukur adalah persentase motilitas, viabilitas, dan

abnormalitas. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan uji *paired two sample t test* dengan bantuan program *software SPSS 16 for windows dan Microsoft excel*. Hasil penelitian menunjukkan persentase motilitas spermatozoa kelompok P1 dan P2 masing-masing adalah ; 26,9%; dan 38,7%. Persentase viabilitas spermatozoa kelompok P1 dan P2 masing-masing adalah 55,65% dan 40,9%. Persentase abnormalitas P1 dan P2 masing-masing adalah 5,88% dan 7,06%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen beku Simental hasil *sexing*.

Kata Kunci : Bovifree, Semen beku *Sexing*, Tris Kuning Telur

PENDAHULUAN

Sapi Simental berasal dari daerah simme, Switzerland, dan sudah berkembang di Benua Eropa dan Amerika. Karakteristik sapi Simental yaitu memiliki bulu berwarna merah bata, pada bagian lutut dan kepala berwarna putih. Bobot sapi Simental jantan dewasa bisa mencapai sekitar 1150 kg dan bobot sapi betina dewasa sekitar 800 kg. Sapi Simental termasuk sapi tipe pedaging dan tipe perah, terkadang juga dimanfaatkan tenaganya dalam dunia pertanian.

Inseminasi Buatan (IB) merupakan teknologi reproduksi untuk memperbaiki mutu genetik ternak yang telah diterima secara luas oleh peternak. Program IB membantu peternak untuk memperoleh bibit unggul. Program IB mengalami perkembangan melalui penggunaan semen hasil proses pemisahan kromosom X dan Y atau semen *sexing* pada pelaksanaan IB. Pemanfaatan spermatozoa X dan Y diyakini meningkatkan efisiensi program IB dalam usaha peternakan (Setiyani *et al.*, 2018). Pada sapi yang di IB spermatozoa pembawa kromosom X akan menghasilkan pedet betina yang diperlukan untuk memproduksi susu dan sebagai *replacement* indukan dan spermatozoa pembawa kromosom Y akan menghasilkan pedet sapi potong jantan bakalan untuk penggemukan (Kaiin *et al.*, 2017). Spermatozoa yang mengandung kromosom X atau Y dalam sperma berjenis *sexing* memungkinkan terciptanya keturunan dari jenis kelamin yang dipilih (Quelhas *et al.*, 2021). Berbagai pendekatan telah digunakan seperti flowcytometry, sedimentasi albumin, dan kepadatan percoll - sentrifugasi gradien untuk membedakan kromosom X-spermatozoa dan Y-spermatozoa berdasarkan perbedaan kandungan DNA-nya, yang berkisar antara 3,7% hingga 4,2% tergantung pada jenisnya. (Xie *et al.*, 2020). Menurut Hafez (2008). Salah satu metode yang dianggap baik untuk memisahkan spermatozoa sapi adalah metode pemisahan dengan

menggunakan kolom albumin (Bovine Serum Albumin, BSA). Metode ini tidak memiliki dampak yang merusak pada integritas akrosom spermatozoa atau produksi spermatozoa *sexing*, dan memiliki tingkat konsepsi yang mirip dengan semen non *sexing* lebih dari 85% (Kaiin *et al.*, 2013; Gunawan *et al.*, 2017).

Spermatozoa hasil *sexing* seperti halnya spermatozoa tanpa *sexing* juga memerlukan bahan pengencer yang mampu melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa hasil *sexing* (Susilowati *et al.*, 2002). Jenis bahan pengencer yang dapat digunakan antara lain Tris Kuning Telur dan Bovifree. Pengencer Tris Kuning Telur memiliki bahan atau zat yaitu Tris aminomethane, fruktosa, asam sitrat, kuning telur, antibiotic (penicilin dan streptomycin), Aquabides, serta gliserol yang merupakan krioprotektan untuk melindungi membrane sel spermatozoa guna mencegah terjadinya *cold sock* selama pendinginan pada suhu 5°C. Trisaminomethan, fructose, asam sitrat dan kuning telur merupakan zat yang diperlukan oleh spermatozoa sebagai sumber energi.

Pengencer Bovifree mengandung aquabidest, fructose, gliserol, citric acid, propriety buffers, phospolipids, proprietary membrane protectans and antibiotics (Spectinomycin, Lincomycin, Tylocin, Gentamicin). Sumber nutrisi yang paling mudah dimetabolisme oleh spermatozoa dan paling banyak digunakan adalah karbohidrat, terutama fruktosa (Telihere,1993 disitasi oleh Susilowati *et al.*, 2021).

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di UPTD Balai Pembibitan dan Hijauan Pakan Ternak Sembawa, Banyuasin, Sumatera Selatan. Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai Desember tahun 2022.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat vagina buatan, tabung penampungan, tabung *sentrifuge*, gelas ukur, gelas *Erlenmeyer*, gelas beaker, gelas objek, *cover glass*, pipet, mikropipet, mikroskop, waterbath, *spectrophotometer*, timbangan elektrik, *stirer*, *centrifuge*.

Bahan yang digunakan adalah sampel semen segar sapi Simental, NaCl fisiologis, eosin negrosin, Medium *Sexing*, Phenol red, BSA 5% (2 gram BSA dilarutkan dengan 40 ml medium *sexing*), BSA 10% (4 gram BSA dilarutkan dengan 40ml medium *sexing*), bahan pengencer Tris Kuning Telur dan bahan pencer Bovifree.

Metode Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah semen dari sapi Simental berumur 4 tahun. Rancangan percobaan yang digunakan adalah percobaan *experimental* dengan 2 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang diberikan sebagai berikut :

P1 : pengencer Tris Kuning Telur (TKT)

P2 : pengencer Bovifree (BF)

Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati adalah motilitas, viabilitas (persentase sperma hidup) dan abnormalitas spermatozoa sapi Simental.

Prosedur Penelitian

Kegiatan penelitian ini terbagi dalam beberapa tahap kegiatan yaitu penampungan semen segar, evaluasi (Makroskopis dan Mikroskopis), proses *sexing* dengan metode kolom BSA dengan inkubasi selam 30 menit, proses pemisahan kolom atas dan kolom bawah, *sentrifugasi* selama 10 menit, proses pengenceran dengan dua jenis bahan pengencer Tris Kuning Telur dan Bovifree, pembekuan, evaluasi semen setelah pembekuan.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *paired two sample t test* dengan bantuan program *software SPSS 16 for windows* dan *Microsoft excel*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penilaian Kualitas Sperma Semen Segar Sapi Simental

Kualitas semen segar sebelum dilakukan perlakuan dilakukan uji kualitas yang meliputi makroskopis dan mikroskopis sesuai dengan standar kualitas semen, seperti yang tertera pada Tabel 1. Berdasarkan data tersebut di atas menunjukkan persentase motilitas semen segar rata rata adalah 70% sehingga memenuhi syarat untuk dapat diproses menjadi semen cair maupun semen beku, karena motilitas menentukan terjadinya fertilisasi. Ratnawati *et al.* (2018) mengatakan bahwa kualitas semen pada sapi PO saat setelah penampungan adalah volume 4,7 + 1,9 ml; pH 6,6+ 0,4; warna cream, konsentrasi 1.286+ 230 juta/ml, motilitas massa 3,0, viabilitas 84+ 6,2 %, motilitas progresif: 71 + 2,2 %; total spermatozoa motil: 4.349+ 22.139,7 juta dan abnormalitas 2,2 + 1,5 %. Sedangkan Kain *et al.*,(2017), menyatakan produksi semen *frozen sexing* menggunakan kolom BSA 5% dan 10% hanya dapat dilakukan jika nilai persentase motilitasnya 60%.

Tabel 1. Hasil Ratan Semen Segar Sapi Simental

Variabel	Rata-rata
Sapi Sampel	
Umur	4 tahun
Bobot Badan (Kg)	658 kg
Uji Kualitas Semen Secara Makroskopis	
Volume per ejakulasi (ml)	5,77
Warna	Putih susu
pH	6,7
Konsisten	Sedang
Uji Kualitas Semen Secara Mikroskopis	
Gerak Massa	++
Motilitas Individu (%)	70
Konsentrasi (juta/ml)	1662,25
Viabilitas (%)	70,25
Abnormalitas (%)	7,1

Sumber: Data penelitian

Dalam aturan Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang semen beku, tidak disebutkan secara detail mengenai angka abnormalitas spermatozoa maximum yang dapat diterima dalam semen untuk diproses menjadi semen beku yang baik. Menurut standar SNI tersebut abnormalitas spermatozoa maksimal 20%, angka ini termasuk abnormalitas primer dan sekunder. Menurut Arifiantini *et al.*,(2010), untuk dilakukan proses menjadi semen beku diharapkan abnormalitas spermatozoa primer tidak melebihi 10 %. Tingkat abnormalitas spermatozoa segar pada penelitian ini seperti terlihat pada tabel 1. rata rata adalah 7,1%,

secara umum dibawah 20%, bisa diterima untuk dilakukan proses sexing semen beku. Peters (2004) menyatakan bahwa tingkat abnormalitas spermatozoa dianggap penting hanya bila terjadi dalam kisaran 18 sampai 20%.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa X Dan Y

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil persentase motilitas sperma X dan Y (Tabel 2). Pada pengencer TKT (P1) rataan spermatozoa yang diperoleh sebesar 30,00% dan spermatozoa Y sebesar 23,75%, kemudian pada pengencer BF (P2) rataan spermatozoa X sebesar 42,50% dan spermatozoa Y sebesar 35,00%. Hasil analisis menunjukkan bahwa adanya perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y antara P1 dan P2 karena $\{P(T \leq t)_{two-tail}\}$ lebih besar dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan bahan pengencer berpengaruh terhadap motilitas

spermatozoa X dan Y. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan pada pengencer TKT dan pengencer BF memiliki perbedaan namun sama-sama masih mampu mempertahankan motilitas spermatozoa X dan Y. Glukosa, fruktosa dan sukrosa merupakan jenis karbohidrat sebagai sumber energi terbaik bagi spermatozoa selama inkubasi, yang berfungsi memelihara tekanan osmotik cairan dan dapat bertindak sebagai krioprotektan. Selanjutnya Salisbury *et al.*, (1985) dalam Stefanus *et al.* (2021), menyatakan penurunan motilitas spermatozoa dapat disebabkan oleh terjadinya penurunan pH dan *cold shock* selama penyimpanan. Motilitas pada pengencer TKT lebih rendah dibandingkan pengencer BF, kemungkinan terjadi karena ada cemaran mikroorganisme, bakteri dan virus yang terjadi saat pembuatan medium pengencer. Kuning telur yang diduga tinggi kontaminasinya berpengaruh menurunkan motilitas dan yang lainnya.

Tabel 2. Hasil rataan persentase motilitas spermatozoa X dan Y sapi Simental

Ulangan	Perlakuan %			
	P1		P2	
	X	Y	X	Y
1	20,00	20,00	45,00	40,00
2	20,00	20,00	40,00	40,00
3	40,00	35,00	45,00	40,00
4	40,00	20,00	40,00	20,00
Jumlah	120,00	95,00	170,00	140,00
Rataan	30,00	23,75	42,50	35,00

Keterangan : Pengencer TKT (P1), Pengencer BF (P2)
 Sumber : Data penelitian

Pengaruh Perlakuan Terhadap Viabilitas Spermatozoa X dan Y

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rata-rata persentase viabilitas spermatozoa X dan Y (Tabel 3). Pada pengencer TKT (P1) rataan spermatozoa X sebesar 57,60% dan spermatozoa Y sebesar 62,75%. Selanjutnya pada pengencer BF (P2) rataan spermatozoa X sebesar 53,35% dan spermatozoa Y sebesar 62,37%. Toelihere (1993) mengatakan bahwa persentase viabilitas hidup memiliki standar minimal 70% dari perhitungan per preparat minimal 200 sel spermatozoa. Hal ini diketahui dari pemeriksaan mikroskop menggunakan pewarnaan eosin-negrosin dan jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna. Pada penelitian ini persentase viabilitas lebih tinggi dibandingkan persentase motilitas karena dalam

motilitas yang dinilai adalah gerak progresifnya, viabilitas adalah proporsi hidup mati spermatozoa. Menurut Pratiwi *et al.* (2019), motilitas terjadi akibat adanya kontraksi serat serabut yang ada di bagian ekor sehingga dengan pewarnaan mungkin saja tidak menyerap warna, tetapi secara fungsional ekor sudah rusak. Spermatozoa masih hidup tetapi rusak pada ekornya menyebabkan terjadinya penurunan motilitas. Kualitas semen yang dapat dipakai untuk inseminasi buatan adalah standar minimal 50% (Toelihere, 1993) dalam Arifiantini, (2010). Hasil analisis menunjukkan bahwa adanya perbedaan viabilitas spermatozoa X dan Y antara P1 dan P2 karena $\{P(T \leq t)_{two-tail}\}$ lebih besar dari 0,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa.

Tabel 3. Hasil rataan persentase viabilitas spermatozoa X dan Y sapi Simental

Ulangan	Perlakuan %			
	P1		P2	
	X	Y	X	Y
1	66	66,5	46	51
2	57	63	52	65,5
3	57	65	62,4	68
4	50,5	56,5	53	65
Jumlah	230,50	251,00	213,40	249,50
Rataan	57,60	62,75	53,35	62,37

Keterangan : Pengencer TKT (P1), Pengencer BF (P2)
 Sumber : Data penelitian

Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa X dan Y

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada tabel 4, diperoleh hasil rataan persentase abnormalitas spermatozoa X dan Y. Pada pengencer TKT (P1) rataan spermatozoa X yang diperoleh sebesar 8,67% dan spermatozoa Y sebesar 3,09%. Kemudian pada pengencer BF (P2) rataan spermatozoa X sebesar 8,67% dan spermatozoa Y sebesar 5,20%.

Hasil analisis t-Test menunjukkan bahwa $\{P(T \leq t)_{two-tail}\}$ lebih besar dari 0,05 artinya perlakuan berpengaruh terhadap abnormalitas kromosom X dan Y. Rataan abnormalitas kromosom X pada P1 dan P2 lebih tinggi dibandingkan dengan rataan abnormalitas kromosom Y pada P1 dan P2. Hal ini bisa terjadi karena pada pengambilan kolom atas (BSA 5%) tercampur dengan lapisan bagian atas dimana di

lapisan ini terdapat spermatozoa abnormal yang tidak mampu menembus kolom BSA. Menurut pendapat Stefanus *et al.*, (2021), setelah proses *sexing* dengan medium BSA, abnormalitas pada spermatozoa X lebih tinggi daripada abnormalitas pada kromosom Y kemungkinan terjadi karena spermatozoa yang abnormal tidak mampu berenang ke bagian lapisan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Selain itu terdapat abnormalitas sekunder yang ditemukan pada saat penelitian yaitu ekor terputus atau kepala tanpa ekor. Abnormalitas sekunder meliputi kepala tanpa ekor, ekor terputus, bagian tengah melipat, terdapat butiran butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosomal terlepas Teliehere (1993). Menurut Arifiantini *et al.*, (2010), kelainan sperma sekunder biasanya karena faktor lingkungan dan relatif mudah diperbaiki.

Tabel 4. Hasil rataan persentase viabilitas spermatozoa X dan Y sapi Simental

Ulangan	Perlakuan %			
	P1		P2	
	X	Y	X	Y
1	3,00	1,95	8,00	3,00
2	5,00	1,00	9,90	2,00
3	12,80	4,00	9,80	8,80
4	13,90	5,40	8,00	7
Jumlah	34,70	12,35	35,70	20,80
Rataan	8,67	3,09	8,92	5,20

Keterangan : Pengencer TKT (P1), Pengencer BF (P2)
 Sumber : Data penelitian

Dari penelitian ini menunjukkan bahwa bahan pengencer mempengaruhi kualitas semen beku *sexing* karena komposisi bahan yang terkandung dalam bahan pengencer tersebut. Arifiantini & Yusuf (2010) menyatakan bahwa pengencer yang digunakan mempengaruhi kualitas semen beku dan itu tergantung pada komposisi bahan yang terdapat di dalamnya. Dari hasil pembekuan yang didapat kemungkinan komposisi pengencer BF lebih sesuai dan mampu memberikan perlindungan sel

spermatozoa *sexing* yang lebih baik pada proses pembekuan dibandingkan dengan pengencer TKT. Hal ini diduga karena pengencer BF merupakan pengencer paten dalam bentuk kemasan sehingga kemungkinan terkontaminasi kecil. Perbedaan ini juga bisa disebabkan komposisi dalam pengencer BF yang mengandung phospholipids. Yulnawati (2008) mengatakan, fungsi Phospholipid adalah memelihara integritas membran dan membentuk

permukaan yang dinamis antar sel sebagai perlindungan terhadap kondisi lingkungan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini $\{P(T \leq t)_{two-tail}\}$ lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan bahan pengencer berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa hasil *sexing*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diberikan kepada kelompok Riset Repronmik Hewan, Pusat Riset Zoologi Terapan, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Balai Riset dan Inovasi Nasional, KST Soekarno, Cibinong Jawa Barat, yang telah memfasilitasi bahan dan metode untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Arifiantini, R.I & Yusuf, T.L. (2010). Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer Dalam Dua Jenis Kemasan Pada Proses Pembekuan Semen Sapi Frisien Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*, 9(3): 1-11.

Gunawan, M., Kaiin, E. M., & Ridwan, R. (2017). Peningkatan produktivitas sapi Bali melalui inseminasi buatan dengan sperma *sexing* di Techno Park Banyumulek , Nusa Tenggara Barat. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv Indonesia*, 3 (2), 216–219.

Kaiin, E.M., Gunawan, M., Octaviana, S. dan Nuswantara, S. (2017). Verifikasi Molekuler Metode *Sexing* Sperma Sapi Dengan Kolom BSA (Bovine Serum Albumin). *Prosiding Semnas Masyarakat Biodiv Indon*, 3(2): 241-245.

Kusumawati, E.D., Krisnaningsih, A.T.N. dan Lele, Y.U. (2017). Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Semen *Sexing* Menggunakan Metode Sedimentasi Putih Telur Dengan Pengencer Yang Berbeda. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Universitas Kanjuruhan Malang*.

Juniandri., Susilawati, T. dan Isnaini, N. (2014). Perbandingan Pengencer Andromed dan CEP-2 terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Hasil Seksing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner*, 15(2): 252-262.

Laos, R., Marawali, A., Kune, P. Belli, H.L.L., Uly, K. (2021). Pengaruh Penambahan Filtrat Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Ke Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Kacang. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(2): 124-135.

Mahfud, A., Isnaini, N., Yekti, A.P.A., Kuswati. dan Susilawati, T. (2019). Kualitas Spermatozoa Post Thawing Semen Beku Sperma Y Hasil *Sexing* Pada Sapi Limousin. *Journal of Tropical Animal Production*, 20(1):1-7.

Maulana, T., Said, S., Arifiantini, R.I. dan Setiadi, M.A. (2016). Sex Sorting Sperm Of Sumba Ongole Bulls By Using Snakehead Fish (*Channa striata*) Albumin Extract. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 44(1): 106-113.

Minitub. (2020). *Leaflet BoviFree*. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH and Co KG. Germany.

Nahra, H.A., Dasrul., Hamdan., Lubis, T.M., Thasmi, C.N. dan Ismail. (2019). Pengaruh Lama Waktu *Sexing* Dengan Metode Elektrik Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Aceh. *JIMVET*, 3(3):149-160.

Priyanto, L., Budiyanto A., Kusumawati, A. (2019). Tingkat Kerusakan DNA Spermatozoa Memengaruhi Profil Protein Spermatozoa pada Semen Beku Sapi Brahman. April. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2018.19.4.512>

Pratiwi, N., Yusuf, T.L., Arifiantini, R.I. dan Sumantri, S. (2019). Kualitas Spermatozoa dalam Modifikasi Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur dengan Tambahan Astaxanthin dan Glutathione pada Tiga Jenis Ayam Lokal. *Acta Veterinaria Indonesiana*, 7(1): 46-54.

Purwantara, B., Arifiantini, R.I., dan Riyadhhi, M. (2010). Penilaian Morfologi Sperma Frisian Holstein Bull Semen dikumpulkan dari Tiga Pusat Inseminasi Buatan di Indonesia. *J.Indonesian Trop. Anim. Agric*. 35(2) Juni.

Quelhas J, Santiago J, Matos B, Rocha A, Lopes G, and Fardilha M. (2021). *Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X- and Y-chromosome-bearing sperm*, *Vet. Med. Sci*, 7:1633–1641.

- Ratnawati, D., Luthfi, M., & Affandhy, L. (2020). Aplikasi Semen Cair Hasil Sexing dengan Gradien Albumin Putih Telur di Kabupaten Lumajang. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner Virtual 2020 Pelaksanaan*, 98-104.
- Stefanus, A.C., Suharyati, S., Siswanto. dan Hartono, M. (2021). Penggunaan Berbagai Macam Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Semen Hasil Sexing Pada Kambing Boer. *Jurnal Riset dan Inovasi Peternakan*, 5(3): 187-194.
- Setiyani, D. S., Yekti, A. P. A., Kuswati, K., & Susilawati, T. (2018). Keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen sexing beku pada Sapi Persilangan Ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 28(3), 259-264.
- Susilowati T. (2002). Sexing Spermatozoa Kambing peranakan Etawah menggunakan Gradien Putih Telur. *Widya Agrika* 10(2) : 97-105.
- Susilowati, T., Hermanto, Sianto, dan Yulianti. (2002). Pemisahan spermatozoa X dan Y pada kambing menggunakan gradien putih telur pada pengencer tris dan tris kuning telur. *Jurnal Ilmu ilmu hayati* 14 (2):176-181.
- Toelihere MR. (1993). *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung, Angkasa.
- Ugur, M.R., Abdelrahman, A.S., Evans, H.C., Gilmore, A.A., Hitit, M., Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Kaya, A. dan Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 1-15.
- Xie Y, Xu Z, Wu Z, and Hong L. (2020). Sex Manipulation Technologies Progress in Livestock: A Review. *Front. Vet. Sci*, 7:1-9.