



PENGARUH MEDIUM GRADIEN PERCOLL DAN LAMA INKUBASI TERHADAP MOTILITAS DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA HASIL SEPARASI SEKS PADA KAMBING PERANAKAN ETAWAH

Pramesti Indah Puspitasari, Mas Yedi Sumaryadi* dan Chomsiatun Nurul Hidayah

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
*email: yedi.sumaryadi@yahoo.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh medium gradien percoll dan lama inkubasi terhadap motilitas dan abnormalitas spermatozoa kambing Peranakan Etawah. Materi yang digunakan yaitu semen dari 2 ekor pejantan kambing Peranakan Etawah, medium percoll, NaCl fisiologis, dan *eosin-negrosin*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2x3 dengan ulangan sebanyak 3 kali dan terdiri dari dua faktor yaitu faktor gradien 40:55 dan 45:60 serta lama inkubasi 30, 45, dan 60 menit. Data penelitian yang telah diperoleh dianalisis variansi dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada interaksi antara medium gradien percoll dan lama inkubasi terhadap motilitas dan abnormalitas ($P > 0,05$), namun setiap faktor memberikan pengaruhnya masing-masing. Berdasarkan faktor gradien percoll pada fraksi atas (Y) didapatkan nilai motilitas dan abnormalitas spermatozoa masing-masing 64,4-72,36% dan 8,46-9,28%, sedangkan untuk spermatozoa fraksi bawah (X) masing-masing yaitu 61,63-68,70% dan 7,27-8,35%. Nilai motilitas dan abnormalitas spermatozoa Y berdasarkan faktor lama inkubasi yaitu 64,16-74,27% dan 8,32-8,85%, sedangkan untuk spermatozoa X yaitu 60,44-71,70% dan 6,24-8,77%. Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah motilitas dan abnormalitas spermatozoa kambing Peranakan Etawah hasil separasi seks terbaik pada gradien percoll 40:55 dengan lama inkubasi 30 menit pada suhu 37°C.

Kata kunci: separasi seks, percoll, lama inkubasi, motilitas, abnormalitas

Abstract. This study aims to determine the effect of Percoll gradient medium and incubation time on the motility and abnormalities of spermatozoa in Etawah Crossbreed goats. The materials used were semen from 2 male Etawah crossbreed goats, Percoll, physiological NaCl, and eosin-negrosin. This research was carried out using a Randomized Block Design (RAK) with a 2x3 factorial pattern with 3 replications and consisting of two factors, namely gradient factors of 40:55 and 45:60 and incubation times of 30, 45 and 60 minutes. The obtained research data was analyzed for variance using Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The results showed no interaction between the Percoll gradient medium and incubation time on motility and abnormalities ($P > 0.05$), but each factor had its influence. Based on the Percoll gradient factor in the upper fraction (Y), the spermatozoa motility and abnormality values were 64,4-72,36% and 8,46-9,28%, respectively, while for the lower fraction spermatozoa (X), each was 61,63-68,70% and 7,27-8,35%. The motility and abnormality values for Y spermatozoa based on incubation time factors are 64,16-74,27% and 8,32-8,85%, while for X spermatozoa they are 60,44-71,70% and 6,24-8,77%. The conclusion obtained from this study was that the motility and abnormalities of spermatozoa in Etawah Crossbreed goats resulted in the best sex separation on a Percoll gradient of 40:55 with an incubation time of 30 minutes at a temperature of 37°C.

Keyword: sex separation, percoll, incubation time, motility, abnormalities

PENDAHULUAN

Kambing Peranakan Etawah (PE) merupakan salah satu jenis kambing lokal hasil persilangan kambing kacang dan etawah yang banyak dibudidayakan di Indonesia (Budisatria *et al.*, 2019). Kambing ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi sebagai kambing tipe dwiguna yaitu penghasil daging dan susu yang



diminati oleh masyarakat. Pemilihan jenis kelamin ternak dapat dilakukan sesuai dengan kebutuhan dan preferensi peternak di lapangan. Peternak dengan komoditas penghasil susu akan berorientasi untuk menghasilkan anak dengan jenis kelamin betina, sedangkan peternak dengan komoditas utama daging dan pembibitan akan lebih berorientasi pada anak dengan jenis kelamin jantan. Kondisi ini memerlukan suatu terobosan teknologi untuk pemisahan spermatozoa berkromosom X dan Y sebagai penentu jenis kelamin anak yang akan dilahirkan. Bioteknologi yang telah ditemukan yaitu berupa separasi seks yang merupakan teknologi pemisahan spermatozoa berkromosom X dan Y yang dapat menentukan jenis kelamin anak yang dihasilkan (Saputra *et al.*, 2022).

Spermatozoa yang telah dilakukan separasi seks dapat dimasukkan ke dalam organ reproduksi betina kambing Peranakan Etawah (PE) melalui teknologi inseminasi buatan. Separasi seks spermatozoa pada kambing Peranakan Etawah (PE) telah banyak dilakukan dengan berbagai media. Media yang dapat digunakan untuk separasi seks pada kambing Peranakan Etawah (PE) yaitu dengan menggunakan medium gradien percoll dengan rata-rata hasil pemisahan 83-89%. Medium gradien percoll lebih baik digunakan dibandingkan dengan media lain karena lebih mudah dalam pembuatan variasi densitasnya (Susilawati, 2014). Spermatozoa membutuhkan waktu untuk menempati media separasi seks dan menembus gradien dengan konsentrasi yang lebih tinggi sehingga proses inkubasi penting dilakukan. Waktu inkubasi yang terlalu lama akan meningkatkan produksi radikal bebas yang berbahaya bagi spermatozoa (Yusrina *et al.*, 2018).

Pemeriksaan motilitas dan abnormalitas spermatozoa penting dilakukan karena berkaitan dengan fertilitas spermatozoa tersebut. Spermatozoa yang memiliki bentuk abnormal memiliki daya gerak progresif atau motilitas yang rendah sehingga tingkat fertilitas spermatozoa tersebut rendah (Hastuti *et al.*, 2020). Motilitas spermatozoa yang tinggi dapat ditandai dengan gerakan aktif progresif dari spermatozoa tersebut sehingga daya fertilitas meningkat (Manehat *et al.*, 2021). Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai separasi seks dengan penggunaan gradien percoll dan lama inkubasi terhadap kualitas spermatozoa khususnya motilitas dan abnormalitas spermatozoa tersebut.

METODE PENELITIAN

Materi penelitian yang digunakan yaitu semen dari 2 ekor pejantan kambing Peranakan Etawah dengan usia 3-4 tahun dan bobot badan sekitar 40-50 kg. Alat yang digunakan berupa vagina tiruan, *micropipet*, *microtip*, pipet, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, *waterbath*, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge*, *microtube*, *stopwatch*, kertas label, *beaker glass*, dan pemanas bunsen. Bahan yang digunakan yaitu medium percoll, NaCl fisiologis, dan larutan *eosin-negrosin*.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2 x 3 dengan ulangan frekuensi penyadapan sebanyak 3 kali dan terdiri dari dua faktor yaitu:

a. Faktor gradien (g) yang terdiri dari dua level yaitu:



g₁ : Medium percoll gradien 40:55

g₂ : Medium percoll gradien 45:60

b. Faktor lama inkubasi (t) dengan suhu 37°C yang terdiri dari 3 level yaitu:

t₁ : Lama inkubasi pada 30 menit

t₂ : Lama inkubasi pada 45 menit

t₃ : Lama inkubasi pada 60 menit

Pengukuran Motilitas

Pengukuran motilitas spermatozoa dilakukan dengan mengamati gerakan aktif progresifnya dan dibandingkan dengan spermatozoa yang tidak motil dengan ciri gerakan mundur dan berputar, serta spermatozoa yang tidak bergerak (mati) yang merupakan kriteria motilitas spermatozoa yang buruk atau tidak aktif progresif dengan perbesaran mikroskop 400X. Perhitungan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan rumus menurut Manehat *et al.* (2021), sebagai berikut :

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{\text{Total spermatozoa} - \text{spermatozoa tidak motil}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100$$

Pengukuran Abnormalitas

Pengukuran abnormalitas dilakukan dengan mengamati spermatozoa yang abnormal menggunakan pewarnaan *eosin-negrosin* baik abnormalitas primer, sekunder, dan tersier dengan perbesaran mikroskop 400X dengan jumlah minimal sebanyak 200 ekor spermatozoa. Perhitungan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan rumus menurut Cahyadi *et al.* (2016), sebagai berikut :

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah sperma abnormal}}{\text{Sperma yang diamati}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang telah diperoleh ditabulasikan, kemudian dianalisis menggunakan RAK (Rancangan Acak Kelompok) pola faktorial. Untuk mengetahui signifikansi rata-rata antar perlakuan dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Awal Semen Kambing Peranakan Etawah

Pemeriksaan awal semen kambing Peranakan Etawah (PE) dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Berdasarkan pemeriksaan awal semen kambing Peranakan Etawah (PE) pada Tabel 1, didapatkan nilai motilitas spermatozoa sebesar $84,73 \pm 0,72$ dan nilai abnormalitas sebesar $5,60 \pm 0,36$. Berdasarkan Tabel 1, volume semen yang didapatkan dari 2 ekor pejantan yaitu sebanyak $2,5 \pm 0,5$. Volume semen kambing pada setiap ejakulasi berkisar antara 0,5-1,5 ml per ekornya (Lele *et al.*, 2017). Warna semen yang normal yaitu putih susu hingga putih kekuningan dengan konsistensi kental. Konsistensi semen berkaitan dengan warna semen tersebut yang apabila konsistensi semen kental maka warnanya akan

semakin pekat dan sebaliknya. pH semen atau derajat keasaman semen yang didapatkan dari hasil penampungan semen segar yaitu $7,00 \pm 0,00$. Variasi pH atau derajat keasaman dipengaruhi oleh kadar asam laktat yang berasal dari hasil akhir metabolisme anaerobik spermatozoa tersebut (Hendri *et al.*, 2017). Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar dan mikroskopis semen cair seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar dan Mikroskopis Semen Cair

| No | Semen Segar | Hasil | Semen Cair | Hasil |
|----|----------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1. | Volume (2 ekor) (mL) | $2,5 \pm 0,5$ | Motilitas (%) | $84,73 \pm 0,72$ |
| 2. | Warna | Putih kekuningan | Viabilitas (%) | $87,92 \pm 2,18$ |
| 3. | Konsistensi | Kental | Abnormalitas (%) | $5,60 \pm 0,36$ |
| 4. | Ph | $7,00 \pm 0,00$ | – | – |
| 5. | Aroma | Khas | – | – |

Hasil Motilitas Spermatozoa Hasil Separasi Seks

Spermatozoa berkromosom X dan Y memiliki perbedaan pada ukuran kepala karena memiliki kandungan DNA yang berbeda. Spermatozoa berkromosom X memiliki kandungan DNA yang lebih banyak sehingga ukuran kepalanya lebih besar dibandingkan dengan spermatozoa berkromosom Y. Prinsip separasi seks dengan gradien percoll didasari oleh perbedaan berat massa antara spermatozoa berkromosom X dan Y, yang apabila berat massa spermatozoa tersebut lebih besar akan mudah mengendap dibawah sehingga spermatozoa X lebih banyak berada difraksi bawah (Fatahillah *et al.* 2016). Prosedur yang dapat dilakukan untuk mengukur ukuran kepala spermatozoa yaitu dengan pengukuran morfometri spermatozoa. Menurut Lailiyah *et al.* (2018) spermatozoa yang memiliki ukuran kepala yang lebih besar dari rata-rata dapat diidentifikasi sebagai spermatozoa berkromosom X dan spermatozoa yang memiliki ukuran lebih kecil dari rata-rata dapat diidentifikasi sebagai spermatozoa berkromosom Y. Hasil pengukuran morfometri penelitian spermatozoa hasil separasi seks dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Morfometri Spermatozoa Hasil Separasi Seks

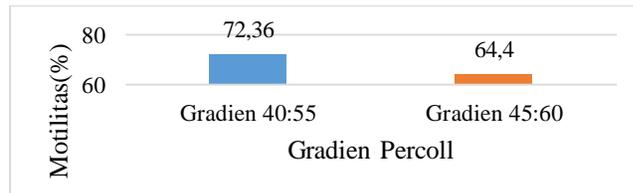
| Semen Cair Kontrol (μm) | | g ₁ | | | g ₂ | | |
|--|-----------------------------------|----------------|------|------|----------------|------|------|
| | | t | t | t | t | t | t |
| | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| $30,833$ $\mu\text{m} \pm 2,5$ | Fraksi Atas (μm) | 7,94 | 7,71 | 8,71 | 8,84 | 7,94 | 8,72 |
| | Fraksi Bawah (μm) | 2,52 | 2,29 | 1,56 | 3,7 | 2,52 | 2,4 |
| | | ∩ | ∩ | ∩ | ∩ | ∩ | ∩ |

Hasil uji t morfometri spermatozoa fraksi atas dan bawah menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$), sehingga proses pemisahan telah berjalan dengan baik yang dapat dilihat dari morfometri spermatozoa tersebut. Berdasarkan Tabel 2 didapatkan hasil bahwa spermatozoa fraksi atas memiliki ukuran yang lebih kecil dari spermatozoa kontrol, sehingga spermatozoa fraksi atas dapat diidentifikasi sebagai spermatozoa Y. Spermatozoa fraksi bawah memiliki ukuran yang lebih besar dari spermatozoa kontrol, sehingga spermatozoa fraksi bawah dapat diidentifikasi sebagai spermatozoa X.

Spermatozoa yang telah terpisah tersebut dapat digunakan untuk inseminasi buatan sesuai dengan kebutuhan peternakan.

a. Fraksi Atas

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi atas berdasarkan perbedaan gradien (konsentrasi) medium seperti tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. Motilitas fraksi atas berdasarkan gradien percoll

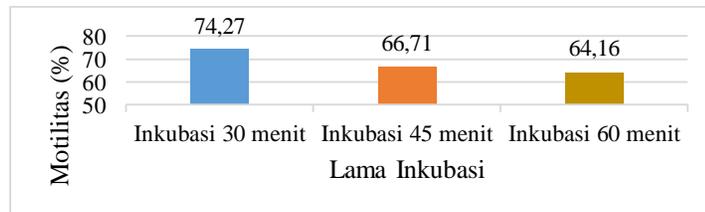
Berdasarkan Gambar 1. gradien 40:55 memiliki motilitas 72,36% dan gradien 45:60 memiliki motilitas sebesar 64,4%. Menurut Kusumawati *et al.* (2019) syarat minimum motilitas spermatozoa yang dapat digunakan untuk inseminasi buatan yaitu 40%. Susilawati *et al.* (2014) menyatakan bahwa rata-rata motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan menggunakan gradien percoll yaitu 61,66% \pm 3,53. Menurut Rasad *et al.* (2019) motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil separasi seks dengan gradien percoll didapatkan hasil 34,73% \pm 4,90. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa Interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun faktor gradien berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas fraksi atas (Y). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Gradien dengan konsentrasi 40:55 memiliki motilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan gradien 45:60. Medium dengan konsentrasi yang semakin tinggi akan memiliki persentase motilitas yang rendah. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa akan membutuhkan energi yang lebih banyak untuk menembus gradien dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan Lazardin *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa akan semakin besar seiring dengan peningkatan densitas media pemisah. Menurut Fatahillah *et al.* (2016) bahwa semakin besar gradien atau konsentrasi yang digunakan akan membuat jarak yang semakin besar sehingga spermatozoa membutuhkan energi yang banyak dan apabila energi tersebut tidak tercukupi maka spermatozoa akan berhenti bergerak dan motilitas spermatozoa akan mengalami penurunan.

Berdasarkan Gambar 2. Lama inkubasi 30 menit memiliki motilitas sebesar 74,27%, lama inkubasi 45 menit menghasilkan motilitas sebesar 66,71%, dan lama inkubasi 60 menit menghasilkan motilitas sebesar 64,16%. Anwar *et al.* (2019) menyatakan bahwa rata-rata motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60 menit yaitu yaitu 63,0% \pm 2,7. Menurut Yusrina *et al.* (2018) motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60

menit yaitu $66,40\% \pm 2,14$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun faktor lama inkubasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas fraksi atas (Y). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi atas berdasarkan perbedaan lama inkubasi seperti tertera pada Gambar 2.



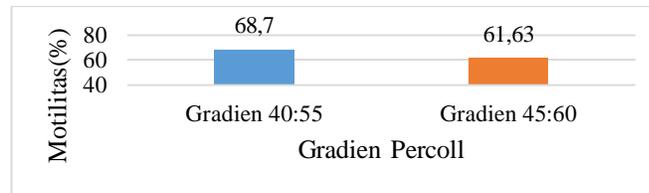
Gambar 2. Motilitas fraksi atas berdasarkan lama inkubasi

Lama inkubasi 30 menit memiliki hasil yg lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 45 dan 60 menit. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa rata-rata terjadi penurunan motilitas untuk setiap kenaikan waktu inkubasi. Menurut Hasbi *et al.* (2011) semakin lama proses inkubasi maka akan mengakibatkan penurunan motilitas yang disebabkan karena adanya proses metabolisme yang berjalan terus menerus hingga spermatozoa kehabisan energi untuk bergerak dan adanya hasil sampingan dari aktivitas metabolisme berupa asam laktat yang bersifat toksik terhadap spermatozoa.

Waktu inkubasi yang lama akan menginisiasi pembentukan radikal bebas berupa hidrogen peroksida yang merupakan hasil samping dari proses metabolisme. Hal tersebut sesuai dengan Mangliari *et al.* (2023) bahwa semakin lama waktu inkubasi akan meningkatkan kadar radikal bebas dan dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa dan spermatozoa yang mati karena proses inkubasi akan menjadi toksik terhadap spermatozoa yang hidup. Radikal bebas yang terkumpul selama proses inkubasi dapat menyebabkan terjadinya peroksida lipid. Peroksida lipid dapat mengakibatkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa dan dapat mengakibatkan tidak adanya komponen asam lemak tak jenuh pada membran dan transport membran yang menginisiasi gerakan spermatozoa sehingga terjadi penurunan motilitas spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan Awuy *et al.* (2021) bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa mengalami penurunan selama proses inkubasi dikarenakan adanya kerusakan membran spermatozoa karena adanya radikal bebas yang bereaksi dengan asam lemak tak jenuh pada membran sel spermatozoa.

b. Fraksi Bawah

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi bawah berdasarkan perbedaan gradien (konsentrasi) medium seperti tertera pada Gambar 3.



Gambar 3. Motilitas fraksi bawah berdasarkan gradien percoll

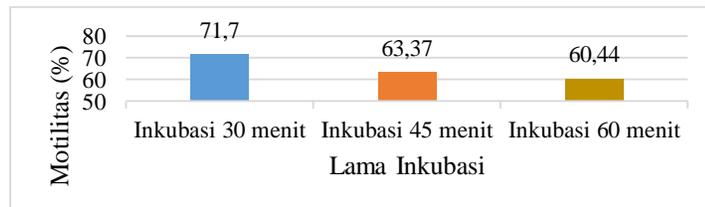
Berdasarkan Gambar 3. gradien 40:55 memiliki motilitas 68,70% dan gradien 45:60 memiliki motilitas sebesar 61,63%. Susilawati *et al.* (2014) menyatakan bahwa rata-rata motilitas spermatozoa hasil *sexing* pada fraksi bawah dengan menggunakan gradien percoll yaitu $60,0\% \pm 5,0$. Menurut Rasad *et al.* (2019) motilitas spermatozoa fraksi bawah dari semen hasil separasi seks didapatkan hasil $39,87\% \pm 20,03$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa Interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun faktor gradien berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas fraksi bawah (X). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Gradien dengan konsentrasi 40:55 memiliki motilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan gradien 45:60. Konsentrasi medium yang semakin tinggi, maka semakin rendah persentase motilitas sperma yang dihasilkan. Hal tersebut dikarenakan spermatozoa akan membutuhkan energi yang lebih banyak untuk menembus gradien dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Sujoko *et al.* (2009) menyatakan bahwa viskositas dan osmolaritas larutan percoll akan berbeda seiring dengan perbedaan konsentrasi gradien yang berbeda yang apabila semakin besar konsentrasi akan memiliki viskositas yang lebih besar dengan osmolaritas yang rendah sehingga gaya gesek sel-sel spermatozoa terhadap gradien makin besar dan tingginya perpindahan larutan percoll ke dalam sel spermatozoa yang merusak permeabilitas membran spermatozoa yang menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa.

Motilitas spermatozoa fraksi bawah (X) memiliki motilitas yang lebih rendah dibandingkan fraksi atas (Y). Hal tersebut sesuai dengan Setiono *et al.* (2022) bahwa motilitas spermatozoa hasil separasi seks dengan gradien percoll diperoleh hasil bahwa spermatozoa fraksi atas (Y) memiliki motilitas spermatozoa yang lebih besar dibandingkan fraksi bawah (X). Perbedaan motilitas spermatozoa fraksi atas (Y) dan fraksi bawah (Y) dapat terjadi dikarenakan perbedaan gradien dan jarak untuk menembus gradien yang bawah. Spermatozoa membutuhkan lebih banyak energi untuk menembus gradien yang lebih tinggi sehingga rata-rata motilitas di fraksi bawah akan lebih rendah. Hasil motilitas spermatozoa hasil separasi seks lebih rendah dibandingkan motilitas semen segar yang telah diamati sebelumnya. Fatahillah *et al.* (2016) menyatakan bahwa penurunan motilitas spermatozoa setelah separasi seks dapat dipengaruhi oleh faktor medium, pengaruh mekanis sentrifugasi, dan suhu proses separasi seks. Bondan *et al.* (2016) bahwa sentrifugasi meningkatkan radikal bebas yang diketahui sebagai *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) karena membran spermatozoa yang rusak. Radikal bebas mempengaruhi regulasi fisiologi spermatozoa selama proses

kapasitas dan hiperaktivasi. Windayanti dan Hariani (2024) menyatakan bahwa rusaknya membran sel spermatozoa karena adanya *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) akan mengganggu proses metabolisme pada mitokondria sehingga terjadi penurunan produksi *adenosin triphosphat* (ATP) yang mengakibatkan gangguan pada pergerakan spermatozoa.

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi bawah berdasarkan perbedaan lama inkubasi seperti tertera pada Gambar 4.



Gambar 4. Motilitas fraksi bawah berdasarkan lama inkubasi

Berdasarkan Gambar 4. Lama inkubasi 30 menit memiliki motilitas sebesar 71,7%, lama inkubasi 45 menit menghasilkan motilitas sebesar 63,37%, dan lama inkubasi 60 menit menghasilkan motilitas sebesar 60,44%. Anwar *et al.* (2019) menyatakan bahwa rata-rata motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60 menit yaitu yaitu $63,0\% \pm 2,7$. Menurut Yusrina *et al.* (2018) motilitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60 menit yaitu $64,55\% \pm 1,91$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun faktor lama inkubasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas fraksi bawah (X). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Lama inkubasi 30 menit memiliki hasil yg lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 45 dan 60 menit. Menurut Ferlianthi (2016) bahwa semakin lama proses separasi seks maka spermatozoa akan lebih banyak mengeluarkan energi untuk bergerak menembus gradien yang lebih pekat dan untuk menormalkan kondisi fisiologisnya serta semakin lama waktu inkubasi maka akan terjadi penumpukan asam laktat sebagai hasil akhir proses metabolisme sehingga terjadi penurunan pH yang mengakibatkan penurunan motilitas hingga kematian sel spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan Jaelani dan Zakir (2014) bahwa aktivitas metabolisme spermatozoa menghasilkan asam laktat yang dapat menurunkan pH sehingga terjadi penurunan daya gerak spermatozoa hingga terjadi kematian spermatozoa.

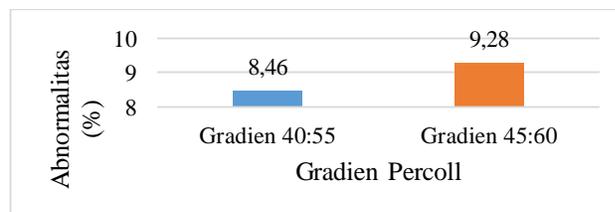
Proses inkubasi mengakibatkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa karena adanya kerusakan pada membran plasma spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan Yatusholikhah *et al.* (2015) bahwa proses inkubasi akan menghasilkan radikal bebas yang mudah bereaksi dengan asam lemak tak jenuh yang mengakibatkan kerusakan membran plasma spermatozoa dan terjadi penurunan motilitas spermatozoa karena rusaknya membran sehingga proses metabolisme yang terhambat sehingga pembentukan ATP yang

merupakan sumber energi spermatozoa berkurang. Spermatozoa yang mati akan mempengaruhi spermatozoa yang masih hidup pada proses inkubasi. Perubahan suhu yang mendadak selama proses inkubasi dapat mengakibatkan spermatozoa *cold shock* dan mati. Hal tersebut sesuai dengan Noviansyah *et al.* (2017) bahwa *cold shock* adalah perubahan suhu yang mendadak menyebabkan penurunan proses metabolisme karena adanya ion seperti potasium dan sodium dapat dengan mudah menembus membran spermatozoa.

Abnormalitas Spermatozoa Hasil Separasi seks

a. Fraksi Atas

Hasil pemeriksaan abnormalitas spermatozoa fraksi atas berdasarkan perbedaan gradien (konsentrasi) medium seperti tertera pada Gambar 5.



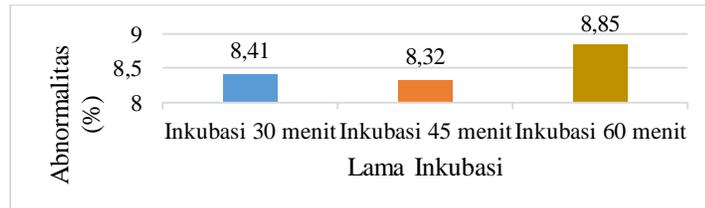
Gambar 5. Abnormalitas fraksi atas berdasarkan gradien percoll

Berdasarkan Gambar 5. gradien 40:55 memiliki abnormalitas sebesar 8,46% dan gradien 45:60 memiliki abnormalitas sebesar 9,28%. Motilitas permatozoa hasil penelitian tergolong baik karena masih memenuhi syarat untuk inseminasi buatan. Persentase abnormalitas hasil penelitian tergolong baik karena masih dibawah 20% sehingga dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Hal tersebut sesuai dengan Barek *et al.* (2020) bahwa persentase abnormalitas yang dapat digunakan untuk inseminasi buatan yaitu dibawah 20%. Menurut Rasad *et al.* (2019) abnormalitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil separasi seks didapatkan hasil $3,46\% \pm 1,03$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) dan faktor gradien tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas fraksi atas (Y).

Faktor gradien tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa fraksi atas. Menurut Susilawati (2014) bahwa spermatozoa Y memiliki daya penetrasi yang tinggi terhadap suhu dan larutan sehingga terkadang konsentrasi dan suhu tidak memberikan pengaruh terhadap spermatozoa Y. Gradien dengan konsentrasi 40:55 memiliki abnormalitas yang lebih rendah dibandingkan dengan gradien 45:60. Medium dengan konsentrasi yang semakin tinggi akan memiliki persentase abnormalitas yang lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan Sujoko *et al.* (2009) bahwa cairan percoll memiliki gesekan internal yang disebabkan oleh gaya kohesi antar molekul sehingga apabila konsentrasi percoll semakin tinggi maka viskositasnya akan semakin kental dan semakin banyak gesekan antar molekul dan spermatozoa yang mengakibatkan tingginya abnormalitas. Peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa hasil separasi seks juga dapat terjadi dikarenakan perlakuan-perlakuan yang diberikan.

Proses separasi seks seperti konsentrasi gradien yang terlalu tinggi, waktu inkubasi yang terlalu lama, dan proses *sentrifuge* yang tidak sesuai berpengaruh terhadap peningkatan abnormalitas sperma. Hal tersebut sesuai dengan Fatahillah *et al.* (2016) bahwa proses sentrifugasi mengakibatkan peningkatan abnormalitas karena benturan dengan dinding tabung sentrifugasi, medium, dan antar spermatozoa. Spermatozoa fraksi atas atau spermatozoa berkromosom Y memiliki persentase abnormalitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa fraksi bawah atau spermatozoa berkromosom X. Hal tersebut sesuai dengan Anwar *et al.* (2019) bahwa spermatozoa yang abnormal lebih banyak berada di fraksi atas dibandingkan dengan fraksi bawah karena spermatozoa yang abnormal tidak dapat menembus gradien yang lebih tinggi sehingga semakin tinggi konsentrasi gradien maka akan semakin banyak spermatozoa yang abnormal karena semakin banyak spermatozoa abnormal yang tersaring.

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi bawah berdasarkan perbedaan lama inkubasi seperti tertera pada Gambar 6.



Gambar 6. Abnormalitas fraksi atas berdasarkan lama inkubasi

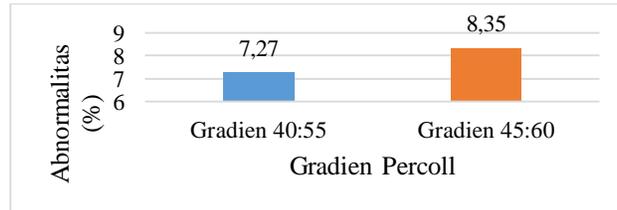
Berdasarkan Gambar 6. Lama inkubasi 30 menit memiliki abnormalitas sebesar 8,41%, lama inkubasi 45 menit menghasilkan abnormalitas sebesar 8,32%, dan lama inkubasi 60 menit menghasilkan abnormalitas sebesar 8,85%. Anwar *et al.* (2019) menyatakan bahwa rata-rata abnormalitas spermatozoa fraksi atas dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60 menit yaitu yaitu $8,0\% \pm 1,2$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) dan faktor lama inkubasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas fraksi atas (Y).

Faktor lama inkubasi tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa fraksi atas. Menurut Susilawati (2014) bahwa spermatozoa Y memiliki daya penetrasi yang tinggi terhadap suhu dan larutan sehingga terkadang konsentrasi dan suhu tidak memberikan pengaruh terhadap spermatozoa Y. Lama inkubasi 45 menit memiliki hasil yg lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 30 dan 60 menit. Abnormalitas paling rendah terdapat pada inkubasi yang paling lama yaitu waktu inkubasi 60 menit. Menurut lipid Yusrina *et al.* (2018) waktu inkubasi yang terlalu lama akan meningkatkan peroksida lipid yang akan merusak membran spermatozoa sehingga dengan kondisi tersebut dapat mengakibatkan abnormalitas. Hal tersebut sesuai dengan Fiqih *et al.* (2021) bahwa semakin lama waktu inkubasi maka peningkatan hidrogen peroksida atau ROS yang berakibat pada kerusakan membran spermatozoa dan apabila membran spermatozoa telah rusak maka akan berpengaruh terhadap persentase motilitas, viabilitas,

dan abnormalitas. Semakin lama waktu inkubasi menyebabkan banyaknya spermatozoa yang mengalami kelainan morfologi seperti *cold shock* karena adanya perubahan suhu ketika proses inkubasi.

b. Fraksi Bawah

Hasil pemeriksaan abnormalitas spermatozoa fraksi bawah berdasarkan perbedaan gradien (konsentrasi) medium seperti tertera pada Gambar 7.



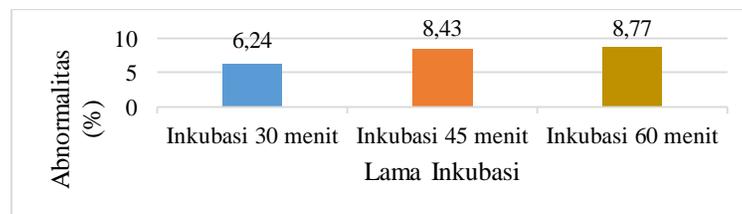
Gambar 7. Abnormalitas fraksi bawah berdasarkan gradien percoll

Berdasarkan Gambar 7. gradien 40:55 memiliki abnormalitas sebesar 8,46% dan gradien 45:60 memiliki abnormalitas sebesar 9,28%. Abnormalitas spermatozoa hasil penelitian tergolong baik karena masih memenuhi syarat untuk inseminasi buatan. Persentase abnormalitas hasil penelitian tergolong baik karena masih dibawah 20% sehingga dapat digunakan untuk inseminasi buatan. Hal tersebut sesuai dengan Berek *et al.* (2020) bahwa persentase abnormalitas yang dapat digunakan untuk inseminasi buatan yaitu dibawah 20%. Menurut Rasad *et al.* (2019) abnormalitas spermatozoa fraksi bawah dari semen hasil separasi seks didapatkan hasil $4,06\% \pm 1,03$. Hasil abnormalitas spermatozoa yang telah didapatkan masih tergolong baik sebagai syarat inseminasi buatan. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa Interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$), namun faktor gradien berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap abnormalitas fraksi bawah (Y). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P<0,01$).

Gradien dengan konsentrasi 40:55 memiliki abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah dibandingkan dengan gradien 45:60. Medium dengan konsentrasi yang semakin tinggi akan memiliki persentase abnormalitas yang tinggi. Hal tersebut sesuai dengan Permana *et al.* (2023) bahwa semen mengalami gesekan dengan medium ketika proses separasi seks yang lebih tinggi yang apabila konsentrasi medium rendah maka spermatozoa akan lebih mudah menembus gradien tersebut. Konsentrasi gradien yang semakin tinggi akan meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Fatahillah *et al.* (2016) menyatakan bahwa konsentrasi medium yang tinggi dan proses sentrifuge berpengaruh terhadap peningkatan abnormalitas yang dikarenakan terjadi benturan antara spermatozoa dengan tabung sentrifuge dan media pemisah dan menyebabkan membran spermatozoa rusak serta mengakibatkan peningkatan abnormalitas spermatozoa. Proses sentrifuge dengan kecepatan yang tinggi dan semakin lama akan meningkatkan abnormalitas karena gesekan yang timbul akan semakin cepat dan semakin lama. Hal tersebut sesuai dengan Mahfud *et al.* (2019) bahwa proses sentrifuge mengakibatkan gesekan atau benturan antar medium dan tabung sentrifuge dengan

spermatozoa sehingga menyebabkan struktur membran spermatozoa rusak dan gangguan metabolisme. Abnormalitas spermatozoa fraksi bawah (X) lebih kecil dibandingkan fraksi atas (Y). Perbedaan persentase abnormalitas spermatozoa tersebut dikarenakan spermatozoa yang abnormal tidak dapat menembus gradien yang lebih besar atau lebih pekat konsentrasinya sehingga persentase abnormalitas spermatozoa fraksi bawah memiliki persentase yang lebih rendah. Hal tersebut sesuai dengan Anwar *et al.* (2019) bahwa spermatozoa abnormal lebih banyak ditemukan pada lapisan atas dibandingkan bawah karena kemampuan gerak spermatozoa yang abnormal akan sulit untuk menembus lapisan dengan viskositas yang lebih tinggi atau lebih pekat.

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa fraksi bawah berdasarkan perbedaan lama inkubasi seperti tertera pada Gambar 8.



Gambar 8. Abnormalitas fraksi bawah berdasarkan lama inkubasi

Berdasarkan Gambar 8. lama inkubasi 30 menit memiliki abnormalitas sebesar 6,24%, lama inkubasi 45 menit menghasilkan motilitas sebesar 8,43%, dan lama inkubasi 60 menit menghasilkan motilitas sebesar 8,77%. Anwar *et al.* (2019) menyatakan bahwa rata-rata motilitas spermatozoa fraksi bawah dari semen hasil *sexing* dengan maksimal lama inkubasi 60 menit yaitu yaitu $4,1,0\% \pm 1,3$. Berdasarkan hasil analisis variansi yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa Interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun faktor lama inkubasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap abnormalitas fraksi bawah (Y). Adapun hasil uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Lama inkubasi 30 menit memiliki hasil yg lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 45 dan 60 menit. Berdasarkan hasil tersebut maka terjadi penurunan abnormalitas spermatozoa untuk setiap kenaikan waktu inkubasi. Hal tersebut sesuai dengan Yusrina *et al.* (2018) bahwa waktu inkubasi yang terlalu lama akan meningkatkan peroksida lipid dan dapat merusak membran spermatozoa. Menurut Laos *et al.* (2021) semakin lama waktu inkubasi maka peningkatan hidrogen peroksida yang menyebabkan peroksida lipid dan kerusakan membran spermatozoa akan semakin tinggi sehingga terjadi peningkatan abnormalitas. Reaksi antara hidrogen peroksida yang berasal dari proses inkubasi dan asam lemak tak jenuh yang merupakan kandungan membran plasma spermatozoa yang mengakibatkan peningkatan abnormalitas spermatozoa karena kerusakan membran plasma spermatozoa. Diliyana *et al.* (2014) menyatakan bahwa induksi peroksidasi lemak dapat meningkatkan abnormalitas spermatozoa. *Reaction Oxydative Species*



(ROS) memiliki peran dalam peroksidasi *lipid* di membran plasma, hal tersebut dikarenakan permeabilitas yang berubah, tidak aktifnya enzim, serta adanya kematian sel.

KESIMPULAN

Motilitas spermatozoa fraksi atas dan bawah dengan konsentrasi gradien 40:55 lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi gradien 45:60; sedangkan lama inkubasi 30 menit lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 45 dan 60 menit. Abnormalitas spermatozoa fraksi atas dengan konsentrasi gradien 40:55 lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi gradien 45:60 dan lama inkubasi 45 menit lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 30 dan 60 menit. Abnormalitas spermatozoa fraksi bawah dengan konsentrasi gradien 40:55 lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi gradien 45:60 dan lama inkubasi 30 menit lebih baik dibandingkan dengan lama inkubasi 45 dan 60 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Jenderal Soedirman melalui Lembaga Pengabdian kepada Masyarakat yang telah memberikan anggaran Riset Institusi melalui dana BLU Universitas Jenderal Soedirman Tahun Anggaran 2021 sesuai dengan Surat Perjanjian kontrak penelitian LPPM Nomor:27.40/UN23.37/PT. 01.03/II/2023. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi, serta Ketua Experimental Farm Fakultas Peternakan atas kerjasamanya dalam pelaksanaan penelitian ini.

REFERENSI

- Abdurrahman, M., D. M. Saleh, dan I. Haryoko. 2019. Effect Of Thawing And Post Thawing Duration With Warm Water (37°C) On The Quality Of Ongole Crossbreed Cattle Spermatozoa. *ANGON: Journal of Animal Science and Technology* 1(3):234-240.
- Anwar., N. Solihati, dan S. D. Rasad. 2019. Pengaruh Medium dan Lama Inkubasi dalam Proses *Sexing* Sperma terhadap Kualitas Semen Kambing Boer. *Jurnal Ilmu Ternak* 19(1):53-61.
- Barek, M. E., K. Uly., W. M. Nalley., H. L. L. Belli, dan T. M. Hine. 2020. Pengaruh Penambahan Sari Wortel dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon. *Jurnal Nukleus Peternakan* 7(2):109-117.
- Bondan, C., E. Zanella., R. Zanella, M. R. Poetini., M. G. Marques, dan J. C. M. Soares. 2016. Oxidative Status of Boar Semen during Storage. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 12(2):95-101.
- Budisatria, I. G. S., D. Maharani, dan A. Ibrahim. 2019. Kambing Peranakan Etawah: Kepala Hitam atau Cokelat. UGM Press, Yogyakarta.
- Cahyadi, T. R. T., M. Christiyanto, dan E. T. Setiatin. 2016. Persentase Hidup dan Abnormalitas Sel Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah (PE) dengan Pakan yang Disuplementasi Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Animal Agriculture Journal* 5(3):23-32.
- Diliyana, Y. F., T. Susilawati, dan S. Rahayu. 2014. Keutuhan Membran Plasma Disekuensing Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Berpengencer Andromed dan CEP-2 yang Ditambahkan Kuning Telur. *Jurnal Veteriner* 15(1):23-30.
- Fatahillah., T. Susilawati, dan N. Isnaini. 2016. Pengaruh Lama Sentrifugasi terhadap Kualitas dan Proporsi Spermatozoa X-Y Sapi Limousin Hasil *Sexing* dengan Gradien Densitas Percoll Menggunakan Pengencer CEP-2 + 10% KT. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1):86-97.
- Ferlianthi, R. 2017. Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Proporsi Sperma Pembawa Kromosom X-Y dan Kualitas Semen Kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Universitas Padjadjaran* 6(1):1-15.



- Hasbi., H. Sonjaya, dan S. Gustina. 2011. Effect of Separation Medium, Addition of Coffee Extract Before Sexing X and Y Sperm Chromosome and Storage Period on Quality of Fresh Semen of Ettawa Cross Goat. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan* 1(2): 107-118.
- Hastuti, A. W., D. Samsudewa, dan E. T. Setiatin. 2020. Pengaruh Penambahan *Indigofera zollingeriana* dalam *Stock Solution* terhadap Motilitas dan Abnormalitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (PE). *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 15(2):167-172.
- Hendri, M., G. Riady, dan R. Daud. 2017. Hubungan Lingkar Skrotum dan Konsentrasi Spermatozoa pada Kambing Peranakan Ettawa (PE) Jantan. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner* 2(1):41-50.
- Jaelani, A., dan M. I. Zakir. 2015. Pengaruh Lama Thawing dalam Air Es (3°C) terhadap Persentase Hidup dan Motilitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Pena: Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi* 26(1)
- Kusumawati, E. D., S. Rahadi., S. Nurwathon, dan D. L. Yulianti. 2019. Kualitas *Post Thawing* Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (PE) pada Suhu 37°C dengan Waktu yang Berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis* 6(2):246-250.
- Lailiyah, F., P. Srianto., A. L. Saputro., S. P. Madyawati., B. Agustono, dan R. A. Prastiya. 2018. Efektifitas Daya Pisah *Electric Separating Sperm* (ESS) terhadap Spermatozoa Kromosom X dan Y pada Kambing Sapera. *Jurnal Medik Veteriner* 1(3):93-98.
- Laos, R., A. Marawali., P. Kune., H. L. L. Belli, dan K. Uly. 2021. Pengaruh Penambahan Filtrat Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) kedalam Pengencer Tris-kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Kacang. *Jurnal Nukleus Peternakan* 8(2):124-135.
- Lele, Y. U., E. D. Kusumawati, E. D, dan A. T. N. Krisnaningsih. 2017. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Semen *Sexing* Kambing Peranakan Etawa (PE) Menggunakan Metode Sedimentasi Putih Telur dengan Pengencer yang Berbeda. *Jurnal Sains Pertenakan* 5(1):50-56.
- Luzardin., T. Saili, dan A. S. Aku. 2020. Hubungan Lama Waktu *Sexing* dengan Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos Sondaicus*) pada Medium *Sexing* Tris-Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu Oleo* 2(1):15-18.
- Mahfud, A., N. Isnaini., A. P. A. Yekti., Kuswati, dan T. Susilawati. 2019. Kualitas Spermatozoa *Post Thawing* Semen Beku Sperma Y Hasil *Sexing* pada Sapi Limousin. *Jurnal Ternak Tropika* 20(1):1-7.
- Manehat F. X., A. A. Dethan, dan P. K. Tahuk. 2021. Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas Spermatozoa, dan pH Semen Sapi Bali dalam Pengencer Sari Air Tebu-Kuning Telur yang Disimpan dalam Waktu yang Berbeda. *Journal of Tropical Animal Science and Technology* 3(2):76-90.
- Mangliari, Y., D. M. Saleh, dan A. P. Nugroho. 2023. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen dalam Pengencer Susu Skim pada Suhu 5° C Terhadap Motilitas dan Fertilitas Spermatozoa Ayam Kampung. *ANGON* 5(1):1-13.
- Noviansyah, L., Tjandrakirana, dan N. Ducha. 2017. Pengaruh Penambahan Soya dalam Pengencer Dasar *Tris-Citric Acid-Fructose* (TCF) terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pembekuan. *LenteraBio* 6(1)
- Permana, F. A., D. M. Saleh., H. S. Widodo, dan C. N. Hidayah. 2023. Abnormalitas dan Morfometri Spermatozoa Kambing Sannen Hasil *Sexing* Menggunakan Bovine Serum Albumin dengan Perbandingan Konsentrasi yang Berbeda. *Angon* 5(3):340-346.
- Rasad, S. D., R. Setiawan., N. Solihati., R. Widyastuti, dan I. Nugraha. 2019. Derajat Pemulihan dan Persentase Spermatozoa X dan Y Kambing Peranakan Etawah Setelah Separasi dengan Gradien Percoll. *Jurnal Veteriner* 20(1):14-19.
- Saputra, A. L., R. A. Prastiya., M. Z. Ulinuha, dan P. Widayani. 2022. Efektifitas Waktu Ekuilibrasi Sebelum Pembekuan Spermatozoa Kambing Sapera Pasca *Electric Separating Sperm*. *Jurnal Medik Veteriner* 5(1)
- Setiono, L. A., R. R. H. Rumende, dan L. Wahyudi. 2022. Kajian Viabilitas Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dengan Pemberian Fosfolipid. *Jurnal Bios Logos* 12(2):122-130.
- Sujoko, H., M. A. Setiadi, dan A. Boediono. 2009. Seleksi spermatozoa domba Garut dengan metode sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner* 10(3):125-132.
- Susilawati, T. 2014. *Sexing* Spermatozoa (Hasil Penelitian Laboratorium dan Aplikasi pada Sapi dan Kambing). UB Press, Malang.
- Windayanti, A. E., dan D. Hariani. 2024. Pengaruh Penambahan Ekstrak Semanggi Air (*Marsilea crenata*) dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Kaligesing. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi* 13(1):105-116.
- Yatusholikhah, I., N. Isnaini, dan M. N. Ihsan. 2016. Pengaruh Penggunaan Pengencer Skim Milk dengan Berbagai Level Filtrat Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus radiates* L.) Terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Simmental pada Suhu Ruang. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production* 16(2):16-24.
- Yusrina, A., N. Solihati, dan N. Hilmi. 2018. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Proses *Sexing* Sperma Berbasis Glutathione terhadap Motilitas dan Membran Plasma Utuh *Chilled* Semen Domba Lokal. *Jurnal Ilmu Ternak* 18(1):41-46.