

PENGARUH WAKTU PEMISAHAN SPERMATOZOA TERHADAP KUALITAS PERMA KERBAU HASIL SEXING

Riasari Gail Sianturi¹ dan Diana Andrianita Kusumaningrum¹

¹Balai Penelitian Ternak – PO Box 221 Bogor 16002

E-mail: gailsianturi@yahoo.com

Corresponding Author Email : da_kusumaningrum@yahoo.com

Abstrak. Telah dilakukan kajian teknologi sexing sperma pada kerbau lumpur dan kerbau sungai, untuk mengetahui pengaruh waktu pemisahan spermatozoa terhadap kualitas spermatozoa hasil sexing. Rancangan penelitian adalah acak lengkap dengan 2 waktu pemisahan (45 vs 60 menit). Kolom pemisahan adalah medium Brackett Oliphant (BO) yang mengandung 10% dan 30% v/v putih telur ayam kampung sebagai fraksi atas (FA) dan fraksi bawah (FB). Data kualitas semen hasil pemisahan dianalisa statistik menggunakan analisis ragam (Anova). Persentase motilitas (%M) semen setelah pemisahan, pada FA - kerbau lumpur adalah 65,0 vs 64,6% dan kerbau sungai 57,5 vs 57,7% untuk waktu pemisahan 45 vs 60 menit berturut-turut. Sedangkan untuk FB, %M setelah pemisahan, kerbau lumpur adalah 64,0 vs 65,6% dan kerbau sungai 55,0 vs 56,4% berturut-turut untuk waktu pemisahan 45 vs 60 menit. Pada pasca *thawing*, %M semen beku hasil pemisahan didapatkan PTM (*post thawing motility*) pada kerbau lumpur berkisar dari 30,9 – 46,7% sedangkan pada kerbau sungai berkisar dari 31,0 – 32,9%. Persentase sperma hidup (%H) pasca *thawing*, baik kerbau lumpur dan sungai untuk 45 dan 60 menit, berkisar dari 72,3 – 82,7% yang menunjukkan daya hidup spermatozoa masih baik. Dapat disimpulkan, hanya semen sexing kerbau lumpur dengan waktu pemisahan 60-menit yang masih layak untuk IB, dengan PTM sesuai SNI, yaitu 46,7%.

Kata Kunci: Kerbau, semen kerbau, sexing sperma, waktu pemisahan

PENDAHULUAN

Kerbau (*Bubalus bubalis*) yaitu ruminansia besar yang mempunyai potensi tinggi dalam penyediaan daging. Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya populasi ternak kerbau disebabkan oleh tingginya angka pemotongan kerbau, keterbatasan bibit unggul, *inbreeding*, mutu pakan ternak rendah dan kurangnya pengetahuan peternak dalam menangani produksi dan reproduksi kerbau (Triwulanningsih dan Praharani, 2006). Pelaksanakan perkawinan secara *outbreeding* untuk perbaikan genetik membutuhkan teknologi inseminasi buatan (IB) karena behaviour kerbau yang didominasi induk dan selalu menolak pejantan baru (Handiwirawan dkk., 2009). Dalam peternakan kerbau, peternak umumnya berharap kerbau-kerbau induknya melahirkan anak-anak yang berkelamin jantan, sehingga perlu dilakukan kajian tentang teknologi pemisahan spermatozoa X dan Y pada kerbau. Secara praktis seleksi jenis kelamin ini bermanfaat untuk menghasilkan pedet jantan atau betina superior sebagai induk untuk menghasilkan susu dan daging; menghasilkan pejantan penghasil daging; dan menghasilkan betina untuk penghasil susu (HAFEZ dan HAFEZ, 2000).

Prinsip pemisahan spermatozoa dengan albumin putih telur ayam adalah albumin putih telur dapat sebagai pengganti *bovine serum albumin* (BSA) atau *human serum albumin* (HSA) yang mahal harganya. Dalam proses pemisahan, sebagai perbedaan kekentalan fraksi/kolom albumin didasarkan pada kecepatan motilitas spermatozoa, dimana spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi adalah spermatozoa pembawa kromosom Y, akan lebih awal menembus kolom/media pemisah albumin yang lebih pekat (Maxwell dan Watson., 1996). Putih telur ayam yang dipakai dalam proses pemisahan spermatozoa dianggap cukup layak untuk digunakan dan cukup efektif memisahkan spermatozoa X dan Y (Saili, 1999; HAFEZ dan HAFEZ, 2000).

Pembuatan semen beku kerbau hasil sexing di Balai Penelitian Ternak menggunakan metode pemisahan dengan media pemisah yang mengandung albumin/putih telur ayam kampung dan juga dengan Bovine Serum Albumine (BSA). Didapatkan hasil *post thawing motility* (PTM) semen beku sexing kerbau lumpur, untuk media pemisah menggunakan albumin ayam kampung rata-rata adalah 48,8% dan 50% (fraksi atas dan fraksi bawah), dan untuk media pemisah BSA adalah 47 dan 45% (fraksi atas dan fraksi bawah). Hasil ini sudah memenuhi syarat SNI untuk dapat digunakan untuk IB pada ternak. Dari sekian banyak metode pemisahan spermatozoa X dan Y yang mudah dilakukan adalah berdasarkan pada perbedaan densitas atau motilitas. Pemisahan spermatozoa X dan Y saat ini yang menghasilkan populasi spermatozoa X dan Y yang terbanyak adalah dengan flow cytometry, akan tetapi alat yang digunakan harganya mahal (JOHNSON *et al.*, 1993; SEIDEL *et al.*, 1997).

Albumin merupakan makromolekul protein yang banyak digunakan dalam media culture. Menurut Kreider *et al.* (1985) *bovine serum albumin* (BSA) bersifat melindungi sperma dari lipid peroksidase. Hal ini terbukti bahwa penambahan BSA dalam media skim milk dan plasma semen meningkatkan presentase motilitas dan motilitas progresif pada awal inkubasi. Sifat-sifat BSA tersebut memberi peluang yang lebih besar penggunaannya dalam pengencer untuk manipulasi semen. Salah satu diantaranya yaitu sebagai media pemisah sperma X dan Y baik pada manusia maupun pada hewan. Metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumin didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y (Afiati, 2004). Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi (Y) akan mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat, sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada medium yang mempunyai konsentrasi rendah.

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui dari penelitian ini adalah pengaruh dari waktu pemisahan sperma terhadap kualitas sperma kerbau lumpur dan kerbau sungai pasca pemisahan.

METODE PENELITIAN

PENAMPUNGAN SEMEN

Sebanyak 4 ekor pejantan kerbau dewasa (2 ekor kerbau lumpur dan 2 ekor kerbau sungai) yang ada di kandang percobaan Ruminansia Besar Balai Penelitian Ternak (Balitnak) – Ciawi, telah digunakan sebagai sumber semen untuk pemisahan/sexing spermatozoa X dan Y. Ternak dikandangan secara individu dan dipelihara menurut manajemen yang ada di kandang percobaan. Pakan rumput dan minuman diberikan secara *ad libitum* sedang konsentrat sebanyak 5kg/hari/ekor diberikan sebagai suplementasi. Semen dikoleksi dengan menggunakan vagina buatan dan segera setelah dikoleksi semen dievaluasi dan hanya semen dengan kualitas baik digunakan sebagai bahan untuk penelitian.

Pembuatan kolom pemisahan spermatozoa dilakukan dengan medium Brackett Oliphant (BO), menggunakan 2 ml medium BO yang mengandung 10 dan 30% v/v putih telur ayam kampung, untuk fraksi atas dan bawah berturut-turut. Fraksi bawah lebih dahulu dimasukkan ke dalam tabung pemisah dengan diameter 1 cm dan kemudian perlahan-lahan masukkan fraksi atas.

PENGECERAN, PEMBEKUAN DAN THAWING

Secepatnya setelah penampungan, semen diencerkan dengan medium Bracket Oliphant (BO) 1:1, lalu disentrifus 1500 rpm selama 10 menit. Setelah supernatant dibuang, pellet semen diencerkan lagi dengan medium BO untuk mencapai konsentrasi 300 juta

spermatozoa/ml. dan sebanyak 1 ml diletakkan diatas permukaan lapisan kolom pemisahan, kemudian dibiarkan selama 45 dan 60 menit. Setelah pemisahan, masing-masing 2 ml fraksi diambil dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Endapan dari FA dan FB dievaluasi dan dihitung konsentrasi dan pengencerannya menggunakan media Tris+20% kuning telur bebek+1mM Glutathione, sehingga konsentasi menjadi $50-100 \times 10^6$ spermatozoa/ml dan dilakukan pembekuan. Proses pembekuan dilakukan dengan metode yang sudah baku di Lab. Reproduksi Balai Penelitian Ternak (Balitnak). Kualitas semen diamati pada saat ekulibrasi (5°C), pasca pembekuan dan juga kulaitas *post thawing*, setelah semen beku disimpan minimal 1 minggu dalam nitrogen cair (LN_2).

RANCANGAN PERCOBAAN

Parameter yang diukur adalah kualitas semen meliputi persentase motilitas (%M), persentase spermatozoa hidup (%LD) dari tiap fraksi sebelum dan sesudah pemisahan, pendinginan/ekuilibrasi pada suhu 5°C dan setelah dicairkan (*thawing*). Data kualitas semen yang terkumpul di analisa statistik menggunakan analisis ragam (Anova). Data diolah menggunakan program SPSS versi 19.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara umum kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi syarat digunakan sebagai materi untuk *sexing* dan diproses menjadi semen beku. Kualitas semen segar dari kerbau lumpur dan kerbau sungai tertera pada Tabel 1, dengan kisaran gerakan massa ++ - +++ (kecuali kerbau sungai1 gerakan masa + - ++), konsentrasi ($1.310 - 1.644 \times 10^6$ spermatozoa/ml), persentase sperma hidup, %H (84,20 – 87,75%) dan tudung akrosom utuh (TAU) berkisar dari 80,00 – 92,75%.

Sedangkan secara makroskopik, volume semen kerbau lumpur lebih rendah dibandingkan kerbau sungai sesuai dengan yaitu 1,78 dan 2,20 ml (kerbau lumpur) dibandingkan 3,05 dan 3,38 ml (kerbau sungai) dan hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilaporkan Sianturi (2012) dan Amin (1998). Secara umum, dalam penelitian ini, semen kerbau lumpur dan sungai memiliki kualitas semen segar yang layak untuk diproses pemisahan dan dibekukan.

Proses pemisahan dilakukan dengan meletakkan secara perlahan-lahan 1 ml suspensi semen tadi diatas kolom pemisah (30 dan 10% albumin/putih telur dalam pengencer Tris-Kuning Telur) selama 45 vs 60 menit. Setelah 45 dan 60 menit, semen dari fraksi atas dan fraksi bawah dicuci dengan media BO dengan cara disentrifus.

Pellet sperma yang dihasilkan dari proses *sexing* dicuci dengan medium Tris dengan cara disentrifus. Pengencer Tris + kuning telur bebek dan penambahan glutathione merupakan pengencer yang cukup baik untuk semen kerbau, terlebih pada proses *sexing* sperma. Dimana pengencer yang mampu melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa, agar kualitas spermatozoa hasil *sexing* dapat dipertahankan (Susilawati et al., 2002). Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh pasca pemisahan dan pencucian tertera pada Tabel 2. Namun konsentrasi ini masih diencerkan dengan media Tris+Kuning telur bebek, untuk mendapatkan konsentrasi $50-100 \times 10^6$ spermatozoa/ml. Dari Tabel 2, didapatkan konsentrasi spermatozoa pada kerbau lumpur, setelah pemisahan dan pencucian berkisar $574 - 616 \times 10^6$ spermatozoa/ml, untuk fraksi atas dan $306 - 485 \times 10^6$ spermatozoa/ml untuk bawah. Sedangkan untuk kerbau sungai didapatkan konsentrasi spermatozoa $522 - 556 \times 10^6$ spermatozoa/ml, untuk fraksi atas dan $458 - 484 \times 10^6$ spermatozoa/ml, untuk fraksi bawah. Kualitas semen pasca pembekuan juga diamati, yaitu kualitas *post thawing*, setelah semen beku disimpan minimal 1 minggu dalam nitrogen cair (LN_2).

Tabel 1. Kualitas semen segar dari empat ekor kerbau sebagai sumber semen sebelum dilakukan pemisahan (*sexing*) sperma X dan Y

Penilaian	Kerbau			
	Lumpur1	Lumpur2	Sungai1	Sungai2
Makroskopik:				
- Volume (ml)	2,20 ± 0,36 ^a	1,78 ± 0,43 ^a	3,05 ± 0,64 ^b	3,38 ± 0,75 ^b
- Warna	krem	krem	krem keputihan	krem keputihan
- Bau	khas	khas	Khas	khas
- Konsistensi	kental	kental	Kental	kental
Mikroskopik:				
- Konsentrasi (juta/ml)	1.310 ± 182	1.644 ± 544	1.490 ± 308	1.390 ± 423
- Gerakan massa*	++ - +++	+++	+ - ++	++ - +++
- Persentase sperma hidup (%)	84,75 ± 7,76	84,20 ± 8,67	85,75 ± 6,90	87,75 ± 6,65
- Persentase Tudung Akrosom Utuh (%)	92,75 ± 5,50	87,00 ± 5,48	81,50 ± 5,07	80,00 ± 8,33

Tabel 2. Konsentrasi spermatozoa (10^6 spermatozoa/ml) setelah proses pemisahan (45 vs 60 menit) dan proses pencucian (sentrifuse).

Tahapan	Kerbau Lumpur		Kerbau Sungai	
	45-menit	60-menit	45-menit	60-menit
Stlh Pemisahan & Sentrifus				
- Fraksi Atas	574,0 ± 158,6	616,0 ± 86,3	522,0 ± 106,9	556,0 ± 107,1
- Fraksi Bawah	485,7 ± 118,7	306,7 ± 73,5	458,3 ± 22,3	484,3 ± 63,7

Untuk gambaran motilitas sperma dari mulai sebelum pemisahan sampai setelah semen beku dicairkan/*thawing* dipaparkan pada Tabel 3. Dapat dilihat bahwa motilitas semen segar yang sudah disentrifus dan dibuang seminal plasmanya cukup baik yaitu berkisar 72,5 -76,7% dan secara umum tidak berbeda diantara kerbau lumpur dan kerbau sungai. Motilitas spermatozoa merupakan suatu parameter yang paling umum, praktis dan mudah untuk diamati dalam penentuan kualitas semen yang akan di IB. Motilitas (%M) memberikan gambaran mengenai kemampuan sperma dalam bergerak secara progresif. Apabila %M tinggi diharapkan akan semakin besar peluang spermatozoa mencapai tempat bertemu dengan ovum, yaitu di saluran tuba falopii dan semakin besar pula peluang untuk terjadinya fertilisasi (pembuahan).

Persentase motilitas setelah pemisahan, untuk fraksi atas pada kerbau lumpur adalah 65,0 dan 64,6% untuk waktu pemisahan 45 menit dan 60 menit berturut-turut, dan pada kerbau sungai 57,5 dan 57,7% untuk 45 menit dan 60 menit berturut-turut. Sedangkan persentase motilitas setelah pemisahan untuk fraksi bawah adalah berkisar dari 56,4 – 64,0 % untuk kerbau lumpur dan sungai dengan kedua waktu pemisahan. Dapat dilihat bahwa proses pemisahan baik dengan waktu 45 vs 60 menit, motilitas semen dari kerbau lumpur lebih baik dibandingkan dengan motilitas semen kerbau sungai baik untuk fraksi atas dan bawah dan untuk kedua metode pemisahan. Secara umum motilitas semen pada fraksi atas sedikit lebih baik daripada motilitas semen fraksi bawah.

Dalam proses pembekuan, yaitu pada tahapan ekuilibrasi pada suhu 5°C, secara umum persentase motilitas semen dengan metode waktu pemisahan baik 45 dan 60 menit tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan. Contohnya untuk kerbau lumpur, yaitu 56,2 dan 54,6 (fraksi atas dan bawah) vs 55,0 dan 56,5% (fraksi atas dan bawah) (Tabel 3.) untuk waktu pemisahan 45 dan 60 menit berturut-turut. Kualitas semen kerbau lumpur pada saat ekuilibrasi juga masih lebih baik dibandingkan dengan kerbau sungai (berkisar 54-56% untuk kerbau lumpur dan 51-54% untuk kerbau sungai).

Tabel 3. Gambaran persentase motilitas (%M) spermatozoa kerbau selama proses pemisahan (sexing), pembekuan dan pasca thawing pada proses pemisahan sperma dengan putih telur ayam kampung

Tahapan	Kerbau Lumpur		Kerbau Sungai	
	45-menit	60-menit	45-menit	60-menit
Stlh Pemisahan & Sentrifus				
- Fraksi Atas	65,0 ± 5,2	64,6 ± 4,7	57,5 ± 7,5	57,7 ± 6,3
- Fraksi Bawah	64,0 ± 5,2	65,0 ± 4,5	55,0 ± 8,9	56,4 ± 3,8
Stlh Pengenceran				
- Fraksi Atas	61,7 ± 3,5	61,8 ± 6,0	57,1 ± 6,6	57,1 ± 6,2
- Fraksi Bawah	61,1 ± 5,5	58,8 ± 6,4	54,2 ± 7,0	55,7 ± 8,4
Ekuilibrasi (5°C)				
- Fraksi Atas	56,2 ± 6,8	55,0 ± 12,8	52,7 ± 6,1	54,6 ± 4,5
- Fraksi Bawah	54,6 ± 5,8	56,5 ± 6,9	51,5 ± 4,7	51,4 ± 6,9
Post Thawing (pencairan)				
- Fraksi Atas	39,2 ± 7,6	46,7 ± 7,1	32,5 ± 3,8	30,8 ± 2,0
- Fraksi Bawah	30,9 ± 5,8	32,7 ± 6,5	32,9 ± 5,7	31,0 ± 5,5

Pada saat pencairan semen beku atau saat thawing, motilitas semen beku hasil pemisahan didapatkan bahwa, *post thawing motility* (PTM) pada kerbau lumpur berkisar dari 30,9 – 46,7% sedangkan pada kerbau sungai berkisar dari 31,0 – 32,9% (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa, semen beku hasil sexing dari kerbau lumpur sebagian masih layak untuk di inseminasikan (IB) yaitu untuk semen beku lumpur – baluran fraksi atas (46,7%), dimana menurut standart SNI, ptm semen beku yang dipakai untuk IB adalah minimal 40%. Namun semen beku fraksi bawah kerbau baluran juga mempunyai PTM <40% sehingga tidak layak untuk diinseminasikan. Dari hasil ini dapat dikntatakan bawah kualitas semen kerbau sungai lebih rendah dibandingkan kerbau lumpur, khususnya setelah mengalami proses pemisahan dan pembekuan semen hasil pemisahan, motilitasnya sangat menurun. Pada kerbau lumpur, PTM semen beku fraksi atas dengan waktu pemisahan 60 menit justru lebih baik dan terjaga kualitasnya dibandingkan dengan waktu 45 menit, walaupun belum diuji secara statistik perbedaannya.

Pada Tabel 4., dipaparkan gambaran data kualitas semen yaitu, persentase sperma hidup (%H) selama proses pemisahan, pembekuan dan post thawing untuk kerbau lumpur dan sungai untuk dua metode pemisahan sperma. Data kualitas %H sebelum pemisahan (semen segar) berkisar dari 84 – 87%, dimana semen ini telah mengalami sentrifugasi untuk membuang seminal plasma dan digantikan dengan BO medium.

Sentrifugasi bertujuan untuk memungkinkan terjadinya proses pemisahan dengan baik, karena dengan adanya seminal plasma, pemisahan sperma dengan kolom pemisah yang berbeda viskositasnya akan sulit, karena dapat terjadi 'jeblos' sehingga tidak terpisah dengan

baik. Untuk kerbau lumpur, %H dari fraksi atas dengan metode pemisahan putih telur dari awal sebelum pemisahan, setelah pemisahan, saat ekulibrasi dan post thawing (waktu pemisahan 45-menit vs 60-menit) adalah 72,3 vs 81,6; 79,9 vs 79,1; 78,2 vs 77,1 dan 61,9 vs 60,5% berturut-turut. Sedangkan untuk fraksi bawah, 82,7 vs 82,5; 85,0 vs 83,9; 73,2 vs 82,8 dan 58,1 vs 58,6% berturut-turut untuk waktu pemisahan 45-menit vs 60-menit pada tahapan setelah pemisahan, saat ekulibrasi dan post thawing. Secara umum persentase semen hidup sampai post thawing masih layak dan dapat digunakan untuk IB, kecuali untuk fraksi bawah pada kerbau lumpur, karena <60%.

Tabel 4. Gambaran persentase sperma hidup (%H) selama proses pemisahan (sexing), pembekuan dan pasca *thawing*

Tahapan	Kerbau Lumpur		Kerbau Sungai	
	45-menit	60-menit	45-menit	60-menit
Stlh Pemisahan & Sentrifus				
- Fraksi Atas	72,3 ± 8,5	81,6 ± 4,6	81,9 ± 9,4	79,8 ± 8,9
- Fraksi Bawah	82,7 ± 11,3	82,5 ± 8,9	76,5 ± 16,7	76,3 ± 9,7
Stlh Pengenceran				
- Fraksi Atas	79,90 ± 8,4	79,1 ± 6,9	83,3 ± 3,7	83,3 ± 6,9
- Fraksi Bawah	85,0 ± 8,9	83,9 ± 7,5	81,2 ± 14,7	83,7 ± 12,0
Ekulibrasi (5°C)				
- Fraksi Atas	78,2 ± 12,0	77,1 ± 12,3	82,7 ± 7,9	83,7 ± 7,2
- Fraksi Bawah	73,2 ± 13,5	82,8 ± 13,3	79,8 ± 16,9	84,3 ± 10,2
Post Thawing				
- Fraksi Atas	61,9 ± 11,5	60,5 ± 13,9	67,2 ± 9,2	73,2 ± 17,5
- Fraksi Bawah	58,1 ± 11,8	58,6 ± 12,2	60,3 ± 23,0	61,8 ± 17,8

Sedangkan untuk kerbau sungai, berdasarkan persentase semen hidup, pada saat post thawing berkisar dari 60-73% namun bila dibandingkan dengan motilitas post thawing (PTM) berkisar 30-32% ternyata sangat berbeda jauh. Ini menandakan bahwa walaupun PTM sudah 30% namun semen hidup masih berkisar 60-70%, hal ini dimungkinkan karena, walaupun spermatozoa sudah tidak motil (bergerak) namun kemungkinan masih hidup.

Dari seluruh data pengamatan Sub Kegiatan 1a, dapat disimpulkan bahwa pemisahan (*sexing*) semen kerbau lumpur masih memungkinkan untuk bisa lebih ditingkatkan lagi. Namun untuk kerbau sungai, dimana belum mendapat PTM sesuai SNI, dan belum layak untuk di IB kan, masih perlu terus diupayakan bagaimana agar mendapatkan semen beku hasil sexing yang lebih baik lagi. Perlakuan waktu pemisahan belum dapat dilakukan, karena, sampai dibawah 60 menit belum dapat dikoleksi semen hasil pemisahan pada fraksi bawah, sehingga masih perlu dikaji ulang lagi waktu terbaik dan tercepat sampai semen sudah dapat dipisahkan.

KESIMPULAN

Kualitas semen beku hasil sexing menggunakan media pemisah putih telur cenderung lebih baik pada kerbau lumpur dibandingkan kerbau sungai. Waktu pemisahan terbaik yang menghasilkan kualitas PTM (*post thawing motility*) terbaik adalah 60 menit, dibandingkan dengan 45 menit. Semen beku hasil sexing yang didapatkan dari penelitian ini, masih layak untuk dipakai untuk IB, khususnya semen beku sexing kerbau lumpur, dengan PTM 46,7% namun perlu terus diupayakan peningkatan kualitas PTM nya.

REFERENSI

- Afiati, F. 2004. Proporsi dan karakteristik spermatozoa X dan Y hasil separasi kolom albumin. *Jurnal Media Peternakan* 27(1):16-20.
- Amin MR. 1998. Efektivitas Plasma Semen Sapi dan Berbagai Pengencer dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). [tesis]. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sianturi, RG. 2012. Dinamika Ovaria Dan Profil Progesteron Selama Siklus Estrus Serta Optimalisasi Inseminasi Buatan Pada Kerbau Rawa. [Disertasi]. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Dasrul, Susilawati dan Susanna, 2000b. Pengaruh berbagai macam tehnik pemisahan terhadap integritas membrane spermatozoa kerbau lumpur, Prosseding Seminar Bioteknologi Reproduksi Brawijaya Universitas Malan Malang
- Ericsson RJ and Glass RH, 1982. Functional Differences Between Sperm Bearing The X-Or Y-Chromosome. *In* Hafez, ESE, 1993. *Reproduction in Farm Animal*. 6th Edition. Lea Febiger. Philadelphia : 441.
- Hafez ESE, 1993b. X and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa. *In* Hafez, ESE, 1993. *Reproduction in Farm Animal*. 6th Edition. Lea Febiger. Philadelphia : 440-444
- Hafez ESE. 2000. *Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA
- Hafez, E.S.E and B.Hafez. (2000). *Reproduksi in farm animal (7th ed)*.USA Lippincot Williams & Wikins.
- Pant HC, Sharma RK, Patel SH, Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, Misra AK, Prabhakar JH. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *Theriogenology* 60:27-34.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi buatan pada ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Putra, A.M., T. Susilawati dan N. Isnaini. 2012. *Kualitas Proporsi Spermatozoa X dan Y Sapi Limousin Setelah Proses Sexing Menggunakan Gradien Densitas Albumin Putih Telur*. *Jurnal Peternakan*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Triwulanningsih, E and L. Praharani. 2006. *Buffaloes in Indonesia*. 2006. *Proceeding of International Seminar on Reproduction Biotechnology*. IRIAP-FFTC. Bogor.