

## Perbandingan Pengencer Andromed dan CEP-2 terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Hasil Seksing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll

(COMPARISON OF ANDROMED AND CEP-2 DILUTER ON THE QUALITY OF LIMOUSIN CATTLE SPERMATOZOEA FOLLOWING SEXING WITH PERCOLL GRADIENT DENSITY CENTRIFUGATION)

Juniandri<sup>1</sup>, Trinil Susilawati<sup>2</sup>, Nurul Isnaini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Ilmu Ternak, <sup>2</sup>Laboratorium Reproduksi Ternak,  
Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,  
Jln. Veteran, Malang, Jawa Timur, 65145  
Telepon 0341-553531, Email : andrijun77@gmail.com

### ABSTRACT

The use of appropriate diluent is intended to ensure the physical and chemical requirements of spermatozoa so that the quality, particularly capacitation can be maintained. This study aimed to determine the quality of Limousin cattle sperm after sexing with density percoll centrifugation method using Andromed diluent and Cauda epididymal Plasma 2 (CEP-2) plus 10% egg yolk. Observations of spermatozoa quality including : motility, viability, percentage of abnormal, concentrations, membrane integrity and state of capacitation. The semen used were obtained from Limousin cattle at the Center for Artificial Insemination (BBIB) Singosari Malang, with motility criteria  $\geq 70\%$ . Data were analysed using a paired T-test in order to determine differences in the use of thinning treatments at each layer. The results showed that both diluent, andromed and CEP-2 diluent plus 10% egg yolk were able to maintain the quality of spermatozoa either in the upper and lower layers.

Keywords : andromed, CEP-2 plus 10% egg yolks, spermatozoa, sexing, centrifugation gradient density percoll

### ABSTRAK

Penggunaan pengencer yang tepat dimaksudkan untuk menjamin kebutuhan fisik dan kimia spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa dapat dipertahankan khususnya pada kemampuan kapasitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas spermatozoa sapi Limousin setelah seksing dengan metode sentrifugasi densitas percoll menggunakan pengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma 2* (CEP-2) ditambah kuning telur 10%. Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, dan di Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang, dari bulan Juni sampai dengan Agustus 2012. Pengamatan kualitas spermatozoa meliputi pemeriksaan motilitas, persentase hidup, persentase abnormal, konsentrasi, pengamatan terhadap integritas membran serta status kapasitas. Semen yang digunakan berasal dari sapi Limousin yang ada di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang, dengan kriteria motilitas  $\geq 70\%$ . Analisis penelitian menggunakan *Uji t berpasangan* (*paired t-test*) untuk mengetahui perbedaan perlakuan penggunaan pengencer pada setiap lapisan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer andromed dapat menjaga kualitas spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah sama atau tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%).

Kata-kata kunci : andromed, CEP-2 ditambah kuning telur 10%, spermatozoa, seksing, sentrifugasi gradient densitas percoll

## PENDAHULUAN

Teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan teknologi reproduksi yang banyak dipilih oleh masyarakat sebagai sarana yang efektif dalam menyebarkan bibit unggul, selain itu teknologi ini dipilih karena biayanya relatif murah. Efisiensi teknologi IB tersebut dapat ditingkatkan lagi dengan keberhasilan dalam menentukan jenis kelamin anak yang akan dilahirkan.

Jenis kelamin dapat ditentukan melalui kromosom yang terdapat pada spermatozoa. Spermatozoa terdiri dari dua jenis, yaitu spermatozoa pembawa kromosom X dan spermatozoa pembawa kromosom Y. Keberhasilan spermatozoa X membuahi sel telur akan menghasilkan anak dengan kelamin betina (XX) dan sebaliknya spermatozoa Y akan menghasilkan anak jantan (XY). Kedua jenis spermatozoa ini mempunyai sifat yang berbeda dalam ukuran dan bentuk antara lain bobot, densitas, motilitas, muatan, dan kandungan biokimia pada permukaannya (Garner dan Hafez, 2008). Berdasarkan perbedaan-perbedaan tersebut sangatlah mungkin untuk memisahkan antara spermatozoa X dan Y.

Teknologi pemisahan spermatozoa X dan Y berdasarkan perbedaan sifat-sifat tersebut telah banyak dilakukan. Salah satu teknologi pemisahan yang dapat diaplikasikan, dengan biaya murah dan terjangkau adalah metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP). Susilawati (2000), telah melakukan sentrifugasi gradien densitas percoll menghasilkan spermatozoa X pada lapisan bawah sebanyak 89%. Sentrifugasi menggunakan 10 gradien dengan kecepatan 2250 rpm selama lima menit mempunyai kemampuan pemisahan yang tinggi yaitu sebesar 83,1%. Namun, Susilawati (2000) juga menambahkan bahwa metode pemisahan ini masih belum optimum karena memiliki kelemahan yaitu selain terjadi peningkatan ion kalsium dalam spermatozoa juga dapat menyebabkan kerusakan struktur membran pada bagian kepala maupun bagian ekor spermatozoa. Hal senada dikemukakan oleh Tucker dan Jansen (2002) bahwa separasi spermatozoa dengan SGDP dapat menyebabkan kerusakan spermatozoa. Salah satu upaya yang mungkin dilakukan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses sentrifugasi adalah dengan penggunaan pengencer. Penggunaan pengencer dimaksudkan untuk menjamin kebutuhan fisik dan kimia

spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa dapat dipertahankan khususnya pada kemampuan kapasitas (Partodihardjo, 1992).

Penelitian ini mencoba membandingkan dua pengencer yang mempunyai kualitas terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa. Pengencer yang digunakan adalah pengencer andromed<sup>®</sup> dan *cauda epididymal plasma-2 + kuning telur 10%*. Pengencer andromed (Minitube Jerman) adalah salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Di sisi lain penggunaan kuning telur telah terbukti mampu memberikan perlindungan terhadap spermatozoa. Kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas sel spermatozoa selama penyimpanan, selain itu glukosa dalam kuning telur menguntungkan spermatozoa karena adanya daya viskositas (Said *et al.*, 2005). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dua pengencer terhadap kualitas spermatozoa sapi *limousin* hasil seksing dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan selama bulan Juni-Agustus 2012. Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak, Fapet dan di Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA, Unibraw, Malang.

Sampel semen segar yang digunakan berasal dari sapi *limousin* yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB), Singosari. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa  $\geq 2+$ , motilitas individu  $\geq 70\%$ . Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu untuk diberi perlakuan sesuai yang ditentukan.

Pembuatan pengencer andromed<sup>®</sup> adalah sebagai berikut: andromed<sup>®</sup> dimasukkan dalam gelas ukur 50 mL. Ditambahkan *aquabidest* dengan perbandingan antara andromed<sup>®</sup> dan *aquabidest* = 1:4, kemudian dihomogenkan. Dimasukkan dalam penangas air dengan suhu 38°C. Pengencer siap untuk digunakan sebagai pengencer semen (Susilawati, 2011).

Komposisi andromed<sup>®</sup> sendiri terdiri dari *Tris hydroxy-aminomethane* sebagai *buffer*, gula sebagai sumber energi, gliserol sebagai

krioprotektan dan antibiotik untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Andromed<sup>®</sup> sebagai pengencer, mengandung lesitin yang berasal dari ekstrak kacang kedelai. Hasil penelitian Aku (2005) didapatkan bahwa di samping lesitin, andromed<sup>®</sup> juga mengandung protein, karbohidrat, mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan *glyceryl phosphoryl choline* (GPC). (Susilawati, 2011).

Pengencer semen yang digunakan adalah CEP-2 yang telah dikembangkan oleh Verberckmoes *et al.*, (2004). Komposisi kimia pengencer CEP-2 adalah : NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 3 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 4 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/L, fruktosa 55 mmol/L, sorbitol 1 g/L, BSA 2 g/L, tris 133,7 mmol/L, gentamicin 0,05 g/L, asam sitrat 42 mmol/L. Bahan-bahan diperoleh dari SIGMA dan dibuat *aliquot*. Osmolaritas pengencer sebesar 320 mOsm, dengan pH sedikit asam yaitu 6,6. Setelah pengencer CEP-2 siap, selanjutnya ditambahkan bahan tambahan sebagai pelindung membran spermatozoa yaitu kuning telur dengan konsentrasi 10%

Uji kualitas semen setelah sentrifugasi meliputi pemeriksaan motilitas individu, persentase hidup, persentase abnormal, konsentrasi, pengamatan terhadap integritas membran serta status kapasitas. Pada pemeriksaan mikroskopis (motilitas individu, persentase hidup, persentase abnormal dan konsentrasi), pemeriksaan dilakukan seperti halnya pada semen segar.

Integritas atau keutuhan membran sel spermatozoa diuji menggunakan *hypoosmotic swelling* (HOS)-*test*. Perubahan yang khas, pada spermatozoa yang membrannya normal yaitu adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujungnya. Spermatozoa yang membrannya tidak normal ditunjukkan dengan ekor lurus, sedangkan status kapasitas spermatozoa dan reaksi akrosom ditentukan dengan metode larutan pewarna *chlortetracycline* (CTC) (Susilawati, 2011).

Data yang diperoleh dan berbentuk persentase ditransformasi, kemudian dianalisis menggunakan uji-t berpasangan untuk mengetahui perbedaan perlakuan penggunaan pengencer pada setiap lapisan (Sastrosupadi, 2000).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen Segar

Hasil evaluasi semen segar meliputi pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis menunjukkan bahwa semen yang diperoleh berada pada kisaran normal dan layak untuk diencerkan. Hasil rata-rata penampungan semen yang diperoleh pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan semen sapi limousin yang digunakan dalam penelitian

Pemeriksaan	Rataan (X±SD)
Volume (mL)	5,00 ± 1,15
Warna	Putih kekuningan
pH	7,00 ± 0,00
Motilitas Massa (%)	++
Motilitas individu (%)	70,00 ± 0,00
Viabilitas (%)	92,12 ± 1,42
Abnormalitas	5,54 ± 3,59
Konsentrasi (10 <sup>6</sup> /mL)	1437,50 ± 450,31
Integritas membran (%)	88,59 ± 3,74
Belum kapasitas (%)	87,55 ± 3,79
Kapasitasi (%)	9,37 ± 2,86
Reaksi akrosom (%)	3,08 ± 1,01

Berdasarkan Tabel 1 hasil pemeriksaan makroskopis semen segar menunjukkan pH 7,00 ± 0,00 dan warna putih kekuningan, hasil ini sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2008), bahwa rata-rata pH semen yang normal antara 6,4 -7,8.

Hasil pemeriksaan mikroskopis menunjukkan gerakan massa ++, motilitas individu 70±0,00% dengan konsentrasi 1437,50±450,31 juta spermatozoa/mL, persentase motilitas dan konsentrasi semen segar yang digunakan sudah memenuhi persyaratan untuk proses lebih lanjut, karena syarat semen segar untuk dapat diproses lebih lanjut adalah memiliki motilitas ≥ 70% (Standar Operasional Pelayanan BIB Sidomulyo Ungaran, 2011). Persentase motilitas semen pada penelitian ini tergolong tinggi, hal ini dimaksudkan agar spermatozoa yang digunakan lebih mampu bertahan selama proses seksing. Semen yang mempunyai persentase motilitas di atas 70% lebih tahan hidup dibanding bila lebih rendah dari 70% (Susilawati *et al.*, 1996).

Rataan konsentrasi spermatozoa segar yang diperoleh adalah  $1437,50 \pm 450,31$  ( $10^6/\text{mL}$ ). Hasil ini masih dalam kisaran konsentrasi spermatozoa sapi yang normal yaitu 800-2000. $10^6/\text{mL}$  (Rauge, 2003). Persentase viabilitas dan abnormalitas spermatozoa semen segar pada penelitian ini berturut-turut  $92,12 \pm 1,42\%$  dan  $5,54 \pm 3,59\%$ . Pada penelitian ini jumlah persentase spermatozoa abnormal adalah  $5,54 \pm 3,59$ . Sapi pejantan dengan persentase spermatozoa abnormal lebih dari 20% menunjukkan adanya infertilitas (Hafez dan Hafez, 2000).

Hasil pengamatan terhadap integritas membran semen menunjukkan nilai sebesar  $88,59 \pm 3,74\%$ . Tingginya persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dalam penelitian ini berkaitan dengan tingginya nilai motilitas massa (++) dan motilitas individu (70%), hal ini sesuai pendapat Saili *et al.*, (2000) bahwa jika motilitas individu spermatozoa tinggi dan motilitas massa mempunyai nilai ++ atau +++ maka nilai integritas spermatozoa akan tinggi pula.

Kondisi fisiologi spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi, dan reaksi akrosom pada semen berturut-turut sebesar  $87,55 \pm 3,79\%$ ;  $9,37 \pm 2,86\%$  dan  $3,08 \pm 1,01\%$ . Keadaan tersebut

menunjukkan bahwa sebagian besar spermatozoa sapi belum mengalami kapasitasi setelah ejakulasi.

**Persentase Uji Kualitas Spermatozoa Sesudah Seksing**

Rataan persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi, total spermatozoa motil, integritas membran dan status kapasitasi (belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa) hasil seksing menggunakan pengencer andromed® dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%, pada lapisan atas dan lapisan bawah disajikan pada Tabel 2.

**Persentase Motilitas Spermatozoa**

Hasil analisis statistika dengan uji-t berpasangan pada motilitas spermatozoa sesudah seksing antara lapisan atas dan lapisan bawah pada pengencer andromed® dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ), begitu pula pada lapisan atas andromed® dan lapisan atas CEP-2 ditambah kuning telur 10% serta antara lapisan bawah andromed® dan lapisan bawah CEP-2 ditambah kuning telur 10%, hasil analisis statistika menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Pengencer andromed® dapat

Tabel 2. Rataan persentase motilitas spermatozoa sapi limousin sesudah seksing

	Lapisan	Perlakuan	
		Andromed®	CEP-2 ditambah kuning telur 10%
Motilitas (%)	Atas	$60,50 \pm 4,38$	$57,00 \pm 6,75$
	Bawah	$58,00 \pm 4,83$	$55,00 \pm 5,77$
Viabilitas (%)	Atas	$91,15 \pm 2,79$	$89,39 \pm 4,21$
	Bawah	$90,08 \pm 4,27$	$88,16 \pm 4,39$
Abnormalitas (%)	Atas	$10,00 \pm 4,86$	$10,73 \pm 4,05$
	Bawah	$10,48 \pm 2,72$	$10,33 \pm 3,22$
Konsentrasi (Juta/mL)	Atas	$750,00 \pm 220,91$	$727,00 \pm 224,85$
	Bawah	$585,50 \pm 233,98$	$616,50 \pm 232,33$
Total Motil (Juta/mL)	Atas	$227,45 \pm 69,70^a$	$210,45 \pm 75,13^{ab}$
	Bawah	$170,03 \pm 68,47^b$	$170,01 \pm 64,09^b$
Integritas Membran (%)	Atas	$83,83 \pm 5,20$	$86,90 \pm 1,01$
	Bawah	$83,03 \pm 4,65$	$83,18 \pm 1,73$
Belum Kapasitasi (%)	Atas	$81,93 \pm 4,75$	$81,85 \pm 4,45$
	Bawah	$85,69 \pm 2,79$	$84,13 \pm 5,87$
Kapasitasi (%)	Atas	$13,37 \pm 1,75$	$14,32 \pm 5,87$
	Bawah	$9,11 \pm 1,69$	$11,22 \pm 4,67$
Reaksi Akrosom (%)	Atas	$4,70 \pm 3,01$	$3,83 \pm 2,05$
	Bawah	$5,20 \pm 1,11$	$4,65 \pm 1,37$

Keterangan : superskrip huruf yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ )

menjaga motilitas spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah sama seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dengan derajat kepercayaan ( $P>0,05$ ).

Pengencer andromed<sup>®</sup> sama baiknya dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam menjaga motilitas spermatozoa hasil seksing (Tabel 1) keadaan ini karena pengencer andromed<sup>®</sup> mengandung gliserol, yaitu zat yang dapat berdifusi ke dalam spermatozoa dan dapat diproses sehingga menghasilkan energi. Dalam keadaan aerob, gliserol berfungsi sebagai fruktosa, lebih sedikit asam laktat yang terbentuk dan spermatozoa menunjukkan aktivitas yang optimum (Aires *et al.*, 2003). Fruktosa dan asam sitrat yang terkandung dalam pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berperan sebagai sumber energi (Simmet, 2005; Verberckmoes *et al.*, 2004), sehingga spermatozoa memiliki energi yang cukup untuk bergerak dan tetap menormalkan kondisi fisiologinya dalam menembus medium albumin.

### Viabilitas Spermatozoa

Pada Tabel 2, ditunjukkan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga viabilitas spermatozoa pada lapisan atas tidak berbeda atau sama ( $P>0,05$ ) seperti lapisan bawah setelah seksing. Hal ini disebabkan karena pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% memiliki substrat nutrisi atau energi bagi spermatozoa yaitu sitrat dan fruktosa. Adanya substrat energi ini dimaksudkan untuk menggantikan peran glukosa yang merupakan salah satu senyawa yang terdapat pada plasma semen. Glukosa merupakan salah satu senyawa yang terdapat dalam plasma semen yang berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Sexton dan Fewless, 1978).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu mengurangi penurunan viabilitas spermatozoa seksing. Keadaan ini diduga karena pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu menyediakan lingkungan yang baik bagi spermatozoa dan melindungi membran, sehingga permeabilitas membran tetap normal. Pratiwi *et al.*, (2006) melaporkan bahwa seksing menggunakan *tris aminomethan* kuning telur memperlihatkan hasil viabilitas spermatozoa pada lapisan atas  $85,0\pm 4,6\%$  dan lapisan bawah  $84,7\pm 8,2\%$ . Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan

CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga viabilitas spermatozoa hasil seksing lebih tinggi daripada *tris aminomethan* kuning telur.

### Abnormalitas Spermatozoa

Hasil analisis uji-t berpasangan memperlihatkan bahwa antar masing-masing perlakuan, abnormalitas spermatozoa tidak berbeda ( $P>0,05$ ) baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah. Hal ini disebabkan karena pengencer andromed<sup>®</sup> maupun CEP-2 ditambah kuning telur 10% mengandung lesitin. Lesitin mempunyai mekanisme kerja mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu dengan berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) (White, 1993). Andromed<sup>®</sup> mengandung lesitin dari kacang kedelai (Aires *et al.*, 2003), sedangkan CEP-2 mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein dari penambahan kuning telur (Aku *et al.*, 2007). Lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

Rataan abnormalitas spermatozoa setelah seksing menggunakan pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berada pada kisaran normal karena tidak lebih dari 20% (Toelihere, 1993). Jika jumlah spermatozoa abnormal tinggi maka akan menurunkan fertilitasnya (Hafez dan Hafez, 2000). Abnormalitas spermatozoa setelah seksing diduga terjadi karena proses sentrifugasi. Sentrifugasi saat pencucian dilakukan selama lima menit dengan kecepatan 1500 rpm. Sentrifugasi mengakibatkan gesekan antar spermatozoa dengan medium maupun spermatozoa dengan dinding tabung. Hal tersebut menyebabkan persentase abnormalitas dan kerusakan membran spermatozoa meningkat (Sujoko *et al.*, 2009).

Abnormalitas spermatozoa hasil penelitian ini (Tabel 2) tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Pamungkas *et al.*, (2005), bahwa seksing menggunakan pengencer *tris aminomethan* kuning telur memperlihatkan abnormalitas spermatozoa pada lapisan atas 8,81% dan bawah 8,48%. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga abnormalitas spermatozoa hasil seksing sama seperti pengencer *tris aminomethan* kuning telur.

### Konsentrasi Spermatozoa

Hasil analisis uji-t berpasangan memperlihatkan bahwa antar perlakuan konsentrasi spermatozoa tidak berbeda ( $P>0,05$ ) baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah. Hal ini kemungkinan karena perbedaan morfologi atau bentuk serta ukuran kepala antara spermatozoa X dan Y. Seksing menggunakan pengencer andromed<sup>®</sup> dapat menjaga konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, begitu pula pada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas sama seperti pada lapisan bawah. Hal ini diduga karena fruktosa yang terkandung dalam pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Simmet, 2005; Verberckmoes *et al.*, 2004). Oleh karena itu spermatozoa memiliki energi yang cukup untuk bergerak dan untuk menormalkan kondisi fisiologinya dalam menembus gradien percoll. Adanya kandungan lesitin dalam pengencer andromed<sup>®</sup> dan kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 yang berperan melindungi membran spermatozoa, sehingga permeabilitas dan integritas membran spermatozoa terjaga tetap normal. Kuning telur mengandung karbohidrat, mineral dan vitamin, sehingga spermatozoa mendapat sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk mempertahankan motilitasnya yang akhirnya dapat menembus gradien percoll. (Belitz *et al.*, 2009; Susilawati *et al.*, 2002).

### Total Spermatozoa Motil

Hasil analisis uji-t berpasangan memperlihatkan bahwa perlakuan total spermatozoa motil sesudah seksing pada pengencer andromed<sup>®</sup> antar lapisan atas dan lapisan bawah memberikan perbedaan ( $P<0,05$ ), sedangkan pada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% tidak berbeda ( $P>0,05$ ). Keadaan ini sesuai dengan tingginya konsentrasi spermatozoa pada kedua lapisan. Konsentrasi spermatozoa pada setiap lapisan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap jumlah total spermatozoa, karena konsentrasi akan berpengaruh secara langsung terhadap perhitungan total spermatozoa motil (Udrayana, 2009). Pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas spermatozoa yang lebih besar dari Standar Nasional Indonesia (SNI), yaitu

motilitas 40% sehingga pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mempertahankan total spermatozoa motil dalam jumlah banyak.

### Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik

Hasil analisis uji-t berpasangan memperlihatkan bahwa antara masing-masing perlakuan memberikan perbedaan yang tidak nyata ( $P>0,05$ ) terhadap integritas membran normal spermatozoa sesudah seksing baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah, hal ini diduga karena spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi yang menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki integritas membran dan metabolisme yang baik.

Kemampuan andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin. Lesitin berperan melindungi membran spermatozoa selama proses seksing, sehingga integritas membran tetap baik. Menurut Sariozkan *et al.*, (2010) komponen yang berpengaruh pada lesitin kedelai adalah *low density lipoprotein* (LDL) yang mirip dengan kuning telur yang berperan melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002).

Ducha *et al.*, (2012) melaporkan bahwa penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 dapat melindungi spermatozoa terhadap *reactive oxygen spesies* (ROS) sehingga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dapat dijaga tetap tinggi dan melindungi keutuhan ultrastruktur spermatozoa. Adanya makromolekul dalam kuning telur berupa lipid dan protein menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga ROS tidak mengoksidasi membran spermatozoa. Oleh karena itu, penggunaan CEP-2 ditambah kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap ROS yang ditunjukkan dengan kadar *malondialdehid* (MDA) dan *superoksida dismutase* (SOD) yang tinggi.

Hammadeh *et al.*, (2001), menyatakan bahwa kuning telur dapat berperan sebagai krioprotektan dan melindungi akrosom spermatozoa dari kerusakan. Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa dengan adanya kuning telur sebagai pengencer, menyebabkan spermatozoa memiliki krioprotektan ekstrasel dan lebih dapat melindungi integritas membran spermatozoa.

### **Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi**

Hasil analisis uji-t berpasangan memperlihatkan bahwa antar perlakuan terhadap spermatozoa belum kapasitasi sesudah seksing tidak berbeda ( $P > 0,05$ ) baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah. Pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa belum kapasitasi setelah seksing pada lapisan atas dan lapisan bawah ditunjukkan dengan tingginya persentase spermatozoa belum kapasitasi (Tabel 2). Spermatozoa belum kapasitasi menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki membran yang masih utuh dan normal, artinya tidak mengalami perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid penyusun membran plasma. Spermatozoa belum kapasitasi memiliki membran yang stabil, tidak terjadi hiperpolarisasi membran dan perubahan aliran ion (Felix *et al.*, 2004).

Pengencer andromed<sup>®</sup> mampu melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya kandungan lesitin nabati yang berperan mempertahankan dan melindungi integritas membran spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Selain itu terjadinya kapasitasi membutuhkan lingkungan yang bersifat basa dan pH intraseluler tinggi (Felix *et al.*, 2004), sedangkan pH pada pengencer CEP-2 bersifat sedikit asam yaitu 6,6. Kuning telur yang ditambahkan dalam CEP-2, berperan sebagai makromolekul yang mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein yang berfungsi mempertahankan dan melindungi membran spermatozoa ketika proses seksing (Susilawati, 2002). Kuning telur juga berperan membantu mencegah kapasitasi dini spermatozoa (Delgado *et al.*, 2009).

### **Persentase Kapasitasi Spermatozoa**

Pada Tabel 2, ditunjukkan bahwa seksing menggunakan pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kapasitasi spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah.

Terjadinya kapasitasi spermatozoa hasil seksing disebabkan karena adanya proses sentrifugasi saat pencucian. Sentrifugasi saat pencucian dilakukan dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit (Susilawati, 2003). Hasil penelitian Safitri (2011) menunjukkan, sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama lima menit menyebabkan kapasitasi spermatozoa kambing sebesar 41,67+5,16%.

Proses sentrifugasi menyebabkan hilangnya *decapacitation factors* (DF) dari membran spermatozoa. Faktor dekapasitasi yang terkandung dalam plasma semen, berperan melindungi stabilitas membran spermatozoa dan mengatur aktivitas  $Ca^{2+}$ -ATPase yang terdapat pada membran kepala spermatozoa. Faktor dekapasitasi mengaktifkan  $Ca^{2+}$ -ATPase untuk mengatur  $Ca^{2+}$  intraseluler agar tetap rendah sehingga proses kapasitasi dan reaksi akrosom tidak berlangsung (Fraser, 1998). Hilangnya faktor dekapasitasi akibat sentrifugasi menyebabkan spermatozoa mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom (Safitri, 2011).

Rendahnya persentase kapasitasi spermatozoa hasil penelitian ini menandakan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses seksing. Kemampuan pengencer andromed<sup>®</sup> melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin nabati yang mampu mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu, lesitin pada pengencer berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) sehingga mampu mempertahankan kestabilan membran (White, 1993). *Bovine serum albumin* (BSA) yang terkandung dalam pengencer CEP-2 berperan mencegah masuknya  $Ca^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol dan melindungi membran spermatozoa sehingga meminimalisir spermatozoa yang kapasitasi dan reaksi akrosom dini. Senyawa BSA merupakan makromolekul yang berperan mengikat  $Ca^{2+}$ , mencegah masuknya  $Ca^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol, memungkinkan membran lebih efektif dalam mengatur pergerakan  $Ca^{2+}$  melewati membran dan menghambat akumulasi  $Ca^{2+}$  intraseluler ketingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas, motilitas dan spermatozoa belum kapasitasi dapat dipertahankan tetap tinggi. Penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap ROS, sehingga dapat mempertahankan spermatozoa belum kapasitasi, meminimalisir kapasitasi, dan reaksi akrosom spermatozoa (Ducha *et al.*, 2012).

### **Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa**

Pada Tabel 2, disajikan bahwa tidak terjadi peningkatan reaksi akrosom pada spermatozoa sesudah seksing, hal ini diperkirakan gaya

sentrifugal tidak berpengaruh terhadap proses fisiologi spermatozoa khususnya pada membran plasma spermatozoa sehingga proses kapasitasi dan reaksi akrosom tidak berjalan cepat, dan adanya pengencer kuning telur pada waktu dilakukan seksing berfungsi sebagai krioprotektan (Yanagimahi, 1989).

Hasil analisis statistika pada reaksi akrosom spermatozoa X (lapisan bawah) dan spermatozoa Y (lapisan atas) sesudah seksing menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Seksing menggunakan pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa dari terjadinya reaksi akrosom pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah.

Terjadinya reaksi akrosom spermatozoa hasil seksing karena adanya proses sentrifugasi yang menyebabkan perubahan fungsi membran akibat berkurangnya membran plasma utuh (Afiati, 2004). Safitri (2011) melaporkan bahwa sentrifugasi terhadap spermatozoa kambing dengan kecepatan 1800 rpm selama lima menit menyebabkan terjadinya reaksi akrosom sebesar  $28,50\pm 3,21\%$ . Menurunnya fungsi membran sebagai kontrol terhadap sistem transpor, karena sentrifugasi menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap ion  $Ca^{2+}$  sehingga konsentrasi ion  $Ca^{2+}$  intraseluler meningkat. Konsentrasi ion  $Ca^{2+}$  intraseluler yang tinggi diperlukan untuk meningkatkan fosforilasi protein tirosin untuk memodulasi gerakan *flagellum* spermatozoa (Asmarinah, 2010; Nas dan Rajesh, 2004) dan penggabungan antara membran plasma dengan membran luar akrosom, sehingga terjadi reaksi akrosom.

Rendahnya persentase reaksi akrosom spermatozoa hasil seksing menggunakan pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menandakan bahwa sebagian besar spermatozoa belum mengalami reaksi akrosom yang berarti spermatozoa masih memiliki tudung akrosom atau membran akrosom masih utuh. Keadaan ini menandakan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa. Sianturi *et al.*, (2004) yang melakukan seksing dengan albumin putih telur dan menggunakan tris sitrat bufer ditambah 20% kuning telur melaporkan bahwa hasil spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh pada lapisan atas  $77,9\pm 4,2\%$  dan lapisan bawah  $79,0\pm 3,9\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed<sup>®</sup> dan CEP-2

ditambah kuning telur 10% dapat melindungi tudung akrosom spermatozoa sama seperti pengencer sitrat buffer ditambah 20% kuning telur.

Pengencer andromed<sup>®</sup> mampu melindungi membran akrosom spermatozoa hasil seksing diduga karena adanya kandungan lesitin kedelai yang mampu melindungi membran spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi tudung akrosom spermatozoa, karena adanya kuning telur yang mengandung lesitin dan lipoprotein yang memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002). Albumin yang terkandung dalam BSA yang terdapat pada pengencer CEP-2, memiliki kemampuan dalam mengikat  $Ca^{2+}$  pada membran plasma. Oleh karena itu, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan  $Ca^{2+}$  melewati membran dan menghambat akumulasi  $Ca^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa. Akumulasi  $Ca^{2+}$  yang berlebihan perlu dikurangi karena peningkatan  $Ca^{2+}$  intraseluler dua kali lipat dibandingkan kondisi normal menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, yaitu penurunan kecepatan dan gerak progresif spermatozoa (Eddy, 2006). Pengencer yang ditambahkan BSA dapat melindungi membran akrosom dan integritas membran spermatozoa (Uysal dan Bucak, 2007). Yamashiro *et al.*, (2006) melaporkan bahwa pengencer yang ditambahkan BSA dapat menjaga motilitas dan keutuhan membran akrosom spermatozoa setelah dibekukan.

Sentrifugasi gradien densitas percoll juga memengaruhi proses fisiologi spermatozoa yang dipisahkan, karena mengakibatkan gesekan mekanis antar spermatozoa dengan medium percoll. Hal tersebut akan memacu proses kapasitasi yang berlanjut dengan adanya fusi antar membran luar akrosom dan ditandai dengan peningkatan konsentrasi ion  $Ca^{2+}$  pada daerah equator membran kepala spermatozoa, dan keadaan ini disebut reaksi akrosom. Tingginya densitas, kecepatan, dan lama sentrifugasi berpengaruh terhadap efektivitas pemisahan. Kombinasi yang tepat antar faktor tersebut akan menghasilkan efektivitas pemisahan yang tinggi dengan spermatozoa yang tetap dapat bertahan hidup (Susilawati, 2000).

## SIMPULAN

Seksing dengan metode sentrifugasi gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dan andromed® dapat menjaga kualitas spermatozoa tetap baik, serta menjaga spermatozoa agar tidak mengalami kapasitas dini setelah proses seksing. Pengencer semen CEP-2 ditambah kuning telur 10% memiliki kemampuan yang sama dengan pengencer komersial andromed® dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kualitas spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah sebaik pengencer andromed®.

## SARAN

Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat digunakan sebagai pengencer semen pada metode sentrifugasi gradient densitas percoll dan perlu dilakukan analisis lebih lanjut tentang penggunaan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada proses pembekuan hasil seksing.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami haturkan kepada Prof Dr Ir M Nur Ihsan, MS dan Dr Ir Sri Wahjuningsih, MSi atas segala saran yang telah diberikan demi perbaikan artikel ini. Ucapan yang sama juga ditujukan kepada rekan-rekan sejawat yang tergabung dalam Tim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Aplikasi Teknologi Terpadu dan Intervensi Masyarakat dalam Rangka Penguatan Sistem Industri Sapi Potong Berbasis Lokal, yang telah membantu penulis selama penelitian dan penyusunan, artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afiati F. 2004. Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. *Media Peternakan* 27(1) : 16-20
- Aires VA, HinschKD, Schloesser FM, SchloesserFM, BognerK, SchloesserSM, HinschE, 2003. In Vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. *Theriogenology* 60(2) : 269-279
- Aku AS, Sandiah N, Sadsoeitoeboen PD, 2007. Manfaat Lesitin Nabati pada Preservasi dan Kriopreservasi Semen: suatu kajian pustaka. *Journal Animal Production* 9 (1) : 49-52.
- Alvarez JG, StoreyBT, 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid From Phospholipid of Human Spermatozoa. *Journal Mol Reprod Dev* 42 : 334-345.
- Asmarinah. 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Majalah Kedokteran Indonesia* 60(8) : 374-380.
- Belitz, HD, GroschW, SchieberleP. 2009. Structure, Physical Properties and Composition Eggs. *Food Chemistry* : 546-561
- Campbell NA, Reece JB, MitchellLG, 2002. *Biology*. 5<sup>th</sup> Ed. Alih bahasa oleh Lestri R, Adil EIM, AnitaN, 2002. Jakarta. Erlangga.
- Delgado MR, Jou RL, LeDoux JE, Phelps EA. 2009. Avoiding negative outcomes: Tracking the mechanisms of avoidance learning in humans during fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 3: 33.
- Dobranic T, SamardzijaM, Cergolj M, PrvanovicN, 2005. Determination of Membrane Integrity of Canine Sperm. *Journal Veterinarski Arhiv* 75 : 23-30.
- Ducha N, SusilawatiT, Aulanni'am, Sri Wahyuningsi, Pangestu M. 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm After Storage in CEP-2 Extender with and without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15 (20) : 979-985
- Eddy EM. 2006. The Spermatozoon. In Knobil & Neill's. *Physiology of Reproduction*. 3<sup>th</sup> Edition. Volume 1. Elsevier Inc: 3-65.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. Edited by B Hafez/ ESE Hafez. South California USA. Pp 96-109.
- Hafez B, Hafez ESE, 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In *Reproduction in Farm Animals*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wikins. Pp 440-443.

- Hafez ESE, 2008. Preservation and Cryopreservation of Gamet and Embryos. In *Reproduction Farm Animal*. Ed by Hafez ESE. 7<sup>th</sup> edition. Blackwell Publishing. Pp 431-442.
- Hafez ESE. 2008. Anatomy of Male in *Reproduction Farm Animal*. Ed by ESE Hafez. 7<sup>th</sup> edition. Blackwell Publishing. Pp 3-13.
- Hammadeh ME, George T, Rosenbaum P, Schmidt W, 2001. Association Between Freezing Agent and Acrosome Damage of Human Spermatozoa From Sub Normal and Normal Sperm. *Journal Andrologia* 32 : 331-336.
- Herdis, Surrachman M, Yulnawati, Rizal M, Maheswari H. 2008. Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Penambahan Maltosa dalam Pengencer Andromed. *J Indon Trop Anim Agric* 33(2) : 101-106.
- Minitub. 2001. *Certificate Andromed. Minitub Abfull und Labortechnik GmbH & Co KG*. Germany.
- Nas RK, Rajesh PB. 2004. Review Role of Tyrosine Phosphorylation in Sperm Capacitation/Acrosome Reaction. *Reprod Biol and Endocrinol* 2(75) : 1-12.
- Pamungkas D, Affandhy L, Wijoyono DBB, Hartati. 2005. Aplikasi Inseminasi Semen Hasil Seksing pada Sapi Induk Peranakan Ongole. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2005. 1-8.
- Partodihardjo S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta. Mutiara Sumber Widya.
- Pratiwi WC, Pamungkas D, Affandhy L, Hartati, 2006. Evaluasi Kualitas Spermatozoa Hasil Seksing pada Kemasan Straw Dingin yang Disimpan pada Suhu 5°C selama 7 Hari. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006. 143-150.
- Safitri DH, 2011. Pengaruh Lama Waktu Sentrifugasi Semen Domba Ekor Gemuk terhadap Persentase Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa. *Artikel Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya:1-11
- Said S, Gunawan M, Kaiin EM, Tappa B, 2005. Daya Tahan Sperma Cair Sapi Simental yang Disimpan dalam Straw pada temperatur 5°C. *Artikel Ilmiah*. Cibinang. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI
- Saili T, Toelihere MR, Boediono A, Tappa B. 2000. Keefektifan Albumin sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y. *Hayati* : 106-109.
- Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN, 2010. The Effects of Diluend Egg Yolk Concentration Used with Soy Bean Lecithin-Based – Extender on Semen Quality of Freeze Bull Semen. *Eurasian J of Vet Sci* 26(1) : 45-49
- Sianturi RG, Situmorang P, Triwulanningsih E, Sugiarti T, Kusumaningrum DA, 2004. Pengaruh Isobutil Metilxantina (IMX) dan Waktu Pemisahan terhadap Kualitas dan Efektifitas Pemisahan Spermatozoa dengan Metode Kolom Albumin Telur. *JITV* 9(4) : 246-251.
- Simmet MVC, 2005. *Bovine Artificial Insemination*. Minitub Abfu-und Labortechnik. GmbH & CO KG. Germany
- Sujoko H, Setiadi MA, Boediono A. 2009. Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner* 10(3) : 125-132.
- Susilawati T, Sumitro SB, Rahayu S, Ciptadi G, Isnaeni N. 1996. *Separation of X-Y Chromosome Bearing Sperm in Indonesia Native Bull With Shepadex G-200*. The 13<sup>th</sup> Tnt. Cong. on Animal Reproduction. Darling Harbour Convention Centre. Sidney. 24: 3.
- Susilawati T. 2000. *Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin*. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Susilawati T. 2002. Seksing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Gradien Putih Telur. *Widya Agrika* 10(2) : 97-105.
- Susilawati T. 2003. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Seksing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur. *Jurnal Ilmiah Ilmu Peternakan dan Perikanan* 20 : 1431-1438.

- Susilawati T. 2011. *Spermatologi*. Malang. Universitas Brawijaya Press.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung. Angkasa.
- Tucker KE, Jansen CAM. 2002. *Sperm Separation Techniques: Comparison and Evaluation of Gradient Product*. Proceedings 2<sup>th</sup> International Workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART Lab.
- Udrayana SB. 2009. Proteksi Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Fosfatidil dalam Proses Seksing dengan Gradien BSA dan Pembekuan. Disertasi. Semarang. Universitas Diponegoro.
- Verberckmoes S, Van Soom A, de Kruit A. 2004. Storage of Fresh Bovine smen in Diluent Based on the Ionic Composition Of Cauda Epididymal Plasma. *J. Reproduction in Domestic Animal* 39 : 1-7
- Visconti PE, Galantino\_HomerH, MooreGD, BaileyJL, NingX, Fornes M, Kopf GS, 1998. The Moleculer Basis of Sperm Capacitation. *Journal of Andrology* 12(2) : 242-246.
- White IG. 1993. Lipid and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation : A Review. *Reproduction and Fertility Development* 639-658.