

Derajat Pemulihan dan Persentase Spermatozoa X dan Y Kambing Peranakan Etawah Setelah Separasi dengan *Gradient Percoll*

(RECOVERY RATE AND PERCENTAGE OF SPERMATOZOA X AND Y OF ETAWAH CROSSBREED GOAT AFTER SEXING WITH GRADIENTT PERCOLL)

Siti Darodjah Rasad, Rangga Setiawan,
Nurcholidah Solihati, Rini Widyastuti, Ilham Nugraha

Laboratorium Reproduksi Ternak & Inseminasi Buatan
Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung–Sumedang km 21,
Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia 45363
Telpon 022 2017202; email: s.d.rasad@unpad.ac.id

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui derajat pemulihan (*recovery rate*) dan persentase spermatozoa kromosom X dan Y pada kambing peranakan etawah (PE) setelah separasi dengan *gradient densitas percoll*. Pengencer yang digunakan adalah Tris + 20% kuning telur. Sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah semen yang berasal dari lima ekor kambing peranakan etawah. *Gradient densitas percoll* dibuat 10 lapisan fraksi dengan lama sentrifugasi 10 menit menggunakan kecepatan 2500 rpm. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata derajat pemulihan (*recovery rate*) spermatozoa X adalah $50,96 \pm 26,70\%$ dan spermatozoa Y: $44,13 \pm 6,11\%$, sedangkan persentase spermatozoa X: $78 \pm 7,06\%$ dan Y: $76,10 \pm 5,95\%$.

Kata-kata kunci: *recovery rates*; spermatozoa X; spermatozoa Y; separasi; *gradient percoll*

ABSTRACT

Aim of the research is to find out recovery rate and percentage spermatozoa X and Y after sexing with gradientt Percoll in Etawah Crossbreed Goat. Extender was used TRIS Egg Yolk. The semen sample from five male Etawah Crossbreed Goat were used in this research. Gradientt percoll performed 10 fraction layer with centrifugation time 10 minute at 2500 rpm. The data were analyzed descriptively. Result of the research shows that average recovery rate of spermatozoa X is $50.96 \pm 26.07\%$ and spermatozoa Y is $44.13 \pm 6.11\%$. Average percentage of X sperm is $78.00 \pm 7.06\%$ and Y sperm is $76.10 \pm 5.95\%$

Key words: recovery rate; spermatozoa X; spermatozoa Y; sexing; gradient percoll

PENDAHULUAN

Penerapan bioteknologi separasi spermatozoa merupakan salah satu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi serta dalam rangka menunjang kegiatan Inseminasi Buatan dengan menggunakan semen beku. Tujuan dari separasi spermatozoa adalah memisahkan spermatozoa kromosom X dengan Y, sehingga harapan jenis kelamin kelahiran ternak dapat

ditentukan sesuai dengan tujuan yang diinginkan.

Teknik pemisahan atau separasi spermatozoa dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain dengan metode *Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll* (SGDP). Prinsip separasi spermatozoa dengan metode *separasi gradient percoll* menurut Hafez (2000) yaitu dengan membuat lapisan-lapisan fraksi dengan konsentrasi yang berbeda dalam tabung sentrifugasi. Proses sentrifugasi selanjutnya

dilakukan dengan kecepatan tertentu, selanjutnya dikemukakan bahwa semakin besar kecepatan separasi, molekul yang memiliki berat massa lebih berat akan menembus lapisan fraksi dengan konsentrasi lebih pekat.

Metode *separasi gradient percoll* lebih efektif dan efisien, namun terdapat faktor-faktor pembatas dalam keberhasilan pemisahan spermatozoa X dan Y di antaranya adalah kerusakan membran spermatozoa akibat gaya mekanis yang terjadi saat proses sentrifugasi dan pencucian spermatozoa yang berdampak pada penurunan kualitas spermatozoa. Kecepatan dan lama sentrifugasi yang tidak tepat selama proses pemisahan spermatozoa juga dapat menyebabkan daya hidup dan motilitas spermatozoa menurun. Penurunan kualitas spermatozoa, selain disebabkan melalui proses pemisahan spermatozoa, juga disebabkan oleh masalah klasik yaitu proses pembekuan. Pembentukan kristal es dan *hypertonic shock* dapat menjadi faktor menurunkan motilitas spermatozoa.

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, dilakukan penelitian dengan tujuan mengetahui *recovery rate* dan morfometrik spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, hasil *separasi gradient percoll* pada semen kambing peranakan etawah (PE).

METODE PENELITIAN

Sampel semen berasal dari lima ekor kambing PE pejantan yang sehat dan berumur dua sampai tiga tahun. Pakan yang diberikan berupa hijauan dan konsentrat. Dalam penelitian ini bahan yang digunakan sebagai pengencer adalah Tris Kuning telur. Media *gradient percoll* yang digunakan mengikuti formula yang dipakai Fatahillah *et al.* (2016) yaitu terdiri dari 21,7% konsentrasi *percoll* dari 2,2 mL volume pengencer TRIS kuning telur.

Penelitian ini diawali dengan penampungan semen menggunakan vagina buatan, dilanjutkan dengan evaluasi semen secara makroskopis dan mikroskopis. Kemudian dilakukan separasi dan pencucian spermatozoa dengan media *percoll*. Inkubasi *gradient percoll* dan sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Kemudian diikuti dengan proses pembekuan spermatozoa X dan Y.

Parameter yang diuji setelah spermatozoa X dan Y dicairkan kembali (*thawing*) adalah:

derajat pemulihan atau *recovery rate* (%) dan persentase spermatozoa X dan Y (%) dengan metode morfometrik. *Recovery rate* semen dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40 kali, dengan membandingkan persentase motilitas semen hasil separasi pre-equilibrasi dengan spermatozoa motil *post-thawing*.

Morfometrik

Preparat ulas spermatozoa dibuat dari masing-masing fraksi semen dengan pewarnaan diferensial menggunakan larutan *eosin* 2%, selanjutnya pengukuran luas kepala spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop mikromanipulator dengan menggunakan lensa mikrometer dengan pembesaran 10 x 100 dan aplikasi DP2-BSW mikroskop Olympus.

Perhitungan *Recovery Rate* (RR) dilakukan dengan rumus: $RR = (\text{Persentase spermatozoa motil post thawing}) \times (\text{Persentase spermatozoa motil semen segar})^{-1} \times 100\%$

Morfometri (Rasio Spermatozoa X dan Y)

Penentuan spermatozoa X dan Y dilakukan dengan aplikasi DP2-BSW mikroskop Olympus, yaitu dengan mengukur luas kepala spermatozoa. Metode yang digunakan untuk mengetahui luas kepala spermatozoa dihitung secara otomatis dengan membuat titik-titik pada pinggiran kepala spermatozoa dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara ukuran spermatozoa yang diprediksi sebagai spermatozoa X dan Y. Nilai yang diperoleh dari setiap ukuran dibandingkan dengan rata-rata nilai ukuran spermatozoa semen segar (kontrol). Nilai yang lebih kecil dari nilai rata-rata luas kepala spermatozoa pada masing-masing kontrol digolongkan spermatozoa Y, sedangkan yang lebih besar digolongkan spermatozoa X. Analisis data yang digunakan adalah analisis statistika deskriptif kuantitatif. Data yang diperoleh diolah dengan mencari *mean* atau nilai rata-rata, standar deviasi, dan dugaan rata-rata populasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan rumus analisis statistika deskriptif menurut Sudjana (2005):

Rataan/*mean* (μ)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$$

Keterangan: $\sum_{i=1}^n Xi$ = Jumlah nilai data peuba; n = banyak data sampel

Standar Deviasi (s)

$$s^2 = \frac{\sum X^2 - (\sum X)^2}{n-1} \text{ atau } s = \frac{\sum_{i=1}^n (Xi-x)^2}{n-1}$$

Keterangan: X_i = peubah ke- i ; \bar{x} = rata-ran sampel; n = banyak data sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berasarkan hasil evaluasi makroskopis dapat diketahui volume semen segar kambing PE yang diperoleh dari hasil penampungan yaitu 0,66 mL. Volume tersebut masih dalam kisaran normal, yaitu 0,5-1,5 mL (Jaenudeen *et al.*, 2000). Volume semen per ejakulat dipengaruhi oleh cara penampungan, bangsa ternak, dan umur ternak. Warna semen segar hasil penelitian ini adalah putih susu dengan konsistensi kental dan masih dalam kisaran normal (Tambing *et al.*, 2000). Tingkat keasaman atau pH semen segar hasil penampungan berkisar berkisar 6,8-7,0 dengan rata-ran 6,84±0,09. Tingkat keasaman/pH yang dihasilkan dari penampungan ini memiliki hasil yang lebih tinggi dari pada yang dilaporkan Kaka *et al.* (2014). Peneliti tersebut melaporkan bahwa pH yang dihasilkan memiliki rata-ran 6,60.

Hasil evaluasi secara mikroskopis berupa gerakan massa, dan gerakan tersebut dalam penelitian ini adalah +++ (Tambing *et al.* (2000), melaporkan gerakan massa semen segar kambing PE adalah +++). Konsentrasi yang diperoleh dari penelitian ini memiliki rata-ran 3968 x 10⁶ sel/mL. Konsentrasi yang diperoleh dari penelitian ini lebih tinggi dari rata-ran hasil penelitian yang dilaporkan Tambing *et al.* (2000), yaitu 2801 x 10⁶ sel/mL. Nilai yang diperoleh dari hasil penelitian ini masih tergolong normal untuk nilai konsentrasi spermatozoa kambing,

yaitu 2000-6000 x 10⁶ sel/mL (Jaenudeen *et al.*, 2000).

Motilitas spermatozoa yang didapat dari hasil penampungan semen dalam penelitian ini memiliki rata-ran 78,8% dan persentase abnormalitas 1,3%. Hal ini menunjukkan bahwa semen segar hasil penampungan layak untuk dibekukan. Tambing *et al.* (2000) menyatakan bahwa syarat minimal persentase motilitas semen dibekukan adalah 70% dan abnormalitas tidak melampaui 15%. Persentase spermatozoa-X semen segar pada penelitian ini adalah 45,50±0,71% dan persentase spermatozoa-Y semen segar 54,5±0,71%.

Recovery Rate Spermatozoa Kambing PE

Hasil pengamatan (Tabel 1) memperlihatkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi setelah proses *thawing* spermatozoa hasil separasi (konsentrasi spermatozoa total awal 396,8 x 10⁷). Hal ini disebabkan karena proses pemisahan antara lapisan atas dan bawah kurang berjalan sempurna, sehingga pada lapisan atas masih banyak tersisa populasi spermatozoa yang seharusnya turun ke lapisan bawah (Fatahillah *et al.*, 2016).

Motilitas semen segar 78,8%, mengalami penurunan setelah proses *thawing* pada hasil separasi, menjadi 39,87% untuk spermatozoa-X dan 34,73% untuk spermatozoa-Y. Menurut Garner dan Hafez (2008), semen yang dibekukan dapat mengalami kerusakan sekitar 40%. Kerusakan sel selama proses pembekuan dan *thawing* disebabkan karena terjadinya peroksidasi lipid pada spermatozoa sehingga dapat menurunkan daya hidup (Park dan Graham, 1993). Motilitas spermatozoa hasil *sexing* secara keseluruhan memiliki angka lebih rendah dari motilitas semen segar (Susilawati *et al.*, 1997). Selain itu, penurunan motilitas

Tabel 1. Kualitas spermatozoa-X dan Y setelah separasi dengan *gradient percoll*

Penilaian	Rataan	
	Spermatozoa-X	Spermatozoa-Y
Konsentrasi Spermatozoa Total (x 10 ⁷)	25,60 ± 14,38	24,73 ± 12,93
Motilitas (%)	39,87 ± 20,03	34,73 ± 4,90
Abnormalitas (%)	4,06 ± 0,68	3,46 ± 1,03

ini karena pengaruh gaya mekanis selama proses sentrifugasi, medium spermatozoa, serta suhu selama proses berlangsung. Jarak untuk menembus lapisan bagian bawah lebih pendek dibanding lapisan atas yang lebih panjang untuk menembus densitas yang lebih pekat, sehingga motilitas spermatozoa pada lapisan atas menghabiskan energi yang lebih banyak. Selain itu *cold shock* menjadi faktor utama yang menyebabkan penurunan motilitas setelah faktor separasi.

Dalam penelitian ini, setelah perlakuan *sexing* dan pembekuan terjadi peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa. Hal ini akibat adanya benturan-benturan pada dinding tabung pada saat proses separasi sehingga merusak morfologi spermatozoa. *Oxidative stress* menjadi salah satu implikasi yang paling penting, karena abnormalitas spermatozoa terjadi melalui induksi peroksidasi lemak. Telah diketahui pula bahwa *Reaction Oxydative Species* (ROS) mungkin yang bertanggung jawab untuk peroksidasi lemak pada membrane plasma, karena terjadi perubahan dalam permeabilitas, ketidakaktifan enzim, dan bahkan kematian sel. Spermatozoa di bawah kondisi aerobik sangat sensitif terhadap bahaya oksidatif karena tingginya kandungan asam lemak tak jenuh dan rendahnya secara relatif level enzim antioksidan (Guamares *et al.*, 2014). Berdasarkan hasil penelitian, *recovery rate* hasil separasi *gradient percoll* diperoleh data seperti disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh rata-rata data *recovery rate* spermatozoa-X sebesar 50,96% dan spermatozoa-Y sebesar 44,13%. Hasil penelitian ini lebih rendah dari hasil penelitian yang dilaporkan Arifiantini *et al.* (2005). Hasil *recovery rate* semen beku sapi FH *post thawing* yang didapat sebesar

59,40±11,24%. Perbedaan persentase ini dipengaruhi oleh perlakuan yang berbeda. Semen beku yang digunakan pada penelitian ini telah dilakukan proses separasi sehingga hasil *recovery rate* menjadi lebih rendah dibanding *recovery rate* hasil penelitian Arifiantini *et al.* (2005). Namun, angka 50 ini masih terbilang baik sebagai *recovery rate* spermatozoa hasil *thawing* untuk digunakan dalam IB.

Proses teknis separasi seharusnya mampu meningkatkan kualitas karakteristik spermatozoa dan menghapus plasma seminalis, spermatozoa mati, dan sel lainnya, termasuk leukosit dan bakteri (Henkel dan Schill, 2003). Banyak teknik separasi telah dikembangkan dengan objek spermatozoa, dan *percoll gradient* terputus sering diaplikasikan oleh asisten lab *in vitro fertilization/IVF* untuk preparasi spermatozoa sapi dengan harapan mendapatkan motilitas tinggi dan jumlah dosis inseminasi, yang diproduksi menggunakan teknik ini (Cesari *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2009). Laporan hasil penelitian Guamares *et al.* (2014) memperlihatkan bahwa preparasi *densitas gradient percoll* dapat meningkatkan konsentrasi. Namun, menurut peneliti tersebut, motilitas tidak selalu meningkat setelah prosedur *percoll* dilakukan dan variasi kecepatan sentrifugasi pada semen sapi khususnya, mesti selalu diperhatikan. Berdasarkan pengamatan terhadap morfologi spermatozoa, terdapat bukti kuat yang secara tidak langsung mengukuhkan bahwa sentrifugasi *gradient percoll* dapat menurunkan persentase perubahan morfologis dalam semen berbagai spesies hewan.

Beberapa laporan penelitian menyarankan agar dilakukan modifikasi untuk meningkatkan hasil dari *gradient percoll* terputus. Modifikasi yang disarankan ini termasuk volume *percoll* yang rendah, kecepatan serta durasi waktu sentrifugasi yang tepat (Folchini *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2009). Pada penelitian ini digunakan *gradient percoll* dengan 10 lapisan, dan 0,5 mL per *gradient*, sehingga secara total dibutuhkan 5 mL *percoll* yang telah dicampur pengencer, dengan kecepatan sentrifugasi sebesar 2500 rpm (Machado *et al.*, 2009). Penelitian terkini yang dilaporkan oleh Fatahillah *et al.* (2016) menggunakan kecepatan kontrol 2250 rpm dengan 10 lapisan *gradient*, sama seperti penelitian yang telah dilakukan ini.

Tabel 2. *Recovery rates* spermatozoa-X dan Y setelah separasi *gradient percoll*

Kambing	Spermatozoa-X	Spermatozoa-Y
%.....	
1	86,30	49,32
2	39,02	36,59
3	20,25	45,57
4	38,96	38,96
5	70,28	50,20
Rataan ± SD	50,96 ± 26,70	44,13 ± 6,11

Persentase Spermatozoa Kromosom-X dan Y

Persentase spermatozoa-X dan Y dapat menjadi ukuran dari keakuratan metode separasi yang digunakan dalam *sexing* spermatozoa. Salah satu cara untuk memprediksi spermatozoa-X dan Y adalah dengan cara mengevaluasi secara morfometrik, yaitu dengan mengukur luas kepala spermatozoa. Data persentase spermatozoa-X dan Y hasil *sexing* separasi dengan *gradient percoll* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan persentase spermatozoa-X hasil *sexing* separasi dengan *gradient percoll*

Kambing	Fraksi Bawah (%)
1	70,50
2	86,00
3	84,50
4	72,00
5	77,00
Rataan ± SD	78,00 ± 7,06

Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang dilaporkan Fatahillah *et al.* (2016), dengan rata-rata proporsi spermatozoa-X fraksi bawah 78,60 ± 6,02%. Ukuran kepala spermatozoa-X memiliki ukuran di atas rata-rata kontrol karena spermatozoa-X mengandung kromatin yang lebih besar (Garner dan Hafez, 2008). Gaya sentrifugasi yang diberikan membuat molekul yang memiliki berat massa yang lebih besar, tertarik ke fraksi bawah dan cepat mengendap, sehingga spermatozoa-X berada di fraksi bawah. Hasil separasi tersebut sesuai dengan laporan Saili (1999), yaitu nilai yang lebih besar dari rata-rata (kontrol) digolongkan sebagai spermatozoa-X sedangkan hasil penelitian pada spermatozoa-Y dapat disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rataan persentase spermatozoa Y hasil *sexing* separasi dengan *gradient percoll*

Kambing	Fraksi Atas (%)
1	72,00
2	86,50
3	73,00
4	73,50
5	75,05
Rata-rata ± SD	76,10 ± 5,95

Hasil pengukuran kepala spermatozoa-Y, diperoleh nilai rata-rata persentase fraksi atas 76,10 ± 5,95 %. Alat yang digunakan untuk mengukur luas kepala spermatozoa yaitu menggunakan mikroskop *fluorescence* yang terhubung dengan komputer khusus yang telah diinstal *software* (Olympus® DP2-BSW, Japan) sebagai aplikasi untuk mengukur luas kepala spermatozoa. Pengukuran dilakukan dengan cara mengambil gambar atau foto preparat diferensial dan mengukur dengan cara memberi garis di sekeliling bagian kepala spermatozoa lalu dikonversi secara otomatis ke dalam aplikasi *Microsoft excel*. Penentuan spermatozoa-X dan Y dilakukan melalui perhitungan rata-rata ukuran kepala spermatozoa semen segar. Spermatozoa yang memiliki ukuran kepala di atas nilai rata-rata, diasumsikan sebagai spermatozoa X dan apabila ukuran kepala spermatozoa di bawah nilai rata-rata diasumsikan sebagai spermatozoa Y. Menurut Susilawati (2003) spermatozoa yang memiliki ukuran kepala di bawah rata-rata adalah spermatozoa Y dan ukuran kepala spermatozoa Y lebih kecil dibandingkan spermatozoa X.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan: bahwa rata-rata *recovery rate* spermatozoa kromosom X dan Y hasil separasi *gradient percoll* adalah 50,9 % untuk spermatozoa X dan 44,23 % untuk spermatozoa Y. Rataan persentase spermatozoa hasil separasi dengan metode morfometrik adalah kromosom X sebesar 78% dan kromosom Y sebesar 76,10%

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Hibah Academic Leadership Grant (ALG 1-1-6).

DAFTAR PUSTAKA

- Arfiantini RI, Yusuf TL, Graha N. 2005. *Longitivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Fresian Holstein menggunakan Bahan Pengencer yang berbeda. Buletin Peternakan* 29(2): 53-61.
- Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW. 2006. Integrated Morphophysiological Assessment of Two Methods For Sperm Selection in Bovine Embryos Production. *Theriogenology* 66: 1185–1193.

- Fatahillah, Susilawati T, Isnaini N. 2016. *Pengaruh Lama Sentrifugasi Terhadap Kualitas dan Proporsi Spermatozoa X-Y Sapi Limousin Hasil Sexing Dengan Gradient Percoll Menggunakan Pengencer CEP-2+10% KT. J Ternak Tropika* 17(1): 86-97
- Folchini NP, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Martin DM, Brum CC, Spiazzi DS. 2012. Use of Mini Percoll modified for selection and reduction of the formation of reactive oxygen species (ROS) on bull sperm (in Portuguese). *Rev Bras Reprod Anim* 36: 239–244.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: *Reproduction in Farm Animal*. Hafez ESE, Hafez B (ed). 7th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Hlm. 96-108.
- Guamares ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwenger EB, Giotto AB, Machado CIU, Goncalves CGM, Folchini NP, Brum DS. 2014. Reduction of Centrifugation Force in Discontinuous Percoll Gradient Increases In Vitro Fertilization rates without reducing bovine Sperm Recovery. *Journal Animal Science* 146: 103-110.
- Hafez ESE. 2000. Preservation and Cryopreservation of gametes and embryos. In: *Reproduction in farm Animal*. Hafez ESE, Hafez B (ed). 7th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
- Henkel RR, Schill. WB 2003. Sperm Preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 1–22.
- Jaenudeen MR, Wahid H, Hafez ESE. 2000. Sheep and Goat. In : *Reproduction in Farm Animals*. Hafez ESE, Hafez B (ed). 7th edition. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kaka A, Nalley MW, Kune P, Burhanuddin. 2014. Persentase Nira Lontar (*Borrassus flabellifer* L) Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah Yang Disimpan Pada Suhu 3-5°C. *Jurnal Nukleus Peternakan* 1(1): 21-27.
- Machado GM, Carvalho JO, Siqueira FE, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN. 2009. Effect of Percoll Volume, Duration and Force of Centrifugation, on In Vitro Production and Sex Ratio of Bovine Embryos. *Theriogenology* 71: 1289–1297.
- Parks JE, Graham K. 1992. Effect of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Sudjana. 2005. *Metode Statistika*. Bandung. Tarsito. Hlm. 4, 7, 67, 101.
- Saili T. 1999. Efektifitas Penggunaan Albumin Sebagai Medium Separasi Dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. *Tesis*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Susilawati T, Sumitro SB, Sutanto H. 1997. Upaya Pembekuan Semen Sapi Hasil Sexing Serta Penerapannya dalam Inseminasi Buatan Pada Sapi Untuk Mendapatkan Pedet Sapi dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. *Laporan Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu*. Malang. Universitas Brawijaya.
- Susilawati T, Mantara Y, Nuryadi. 1999. Pola Kapasitas Spermatozoa X dan Y Sapi Hasil Pemisahan Menggunakan Filtrasi sepadex dan Sentrifugasi gradient densitas percoll. *Jurnal Penelitian Ilmu-Ilmu Hayati* 11: 29-40.
- Susilawati T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *Desertasi*. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Susilawati T. 2003. Perubahan Fungsi Membran Spermatozoa Sapi Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin Menggunakan Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll. *Widya Agrika* 11(1): 27-33.
- Susilawati T, Rahayu S, Diliyana YF. 2014. Keutuhan Membran Spermatozoa Disekuensi Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll Berpengencer Andromed dan CEP-2 yang ditambahkan Kuning Telur. *J Veteriner* 15(1): 23-30.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Utama IK. 2000. Pengaruh Gliserolisasi dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner* 5(2): 1-8

