



JURNAL ILMIAH

ILMU-ILMU PETERNAKAN

Volume IX. No. 3 Edisi Agustus 2006

Daftar Isi

Halaman

- Effects of Dietary Fiber on Solid and Liquid Digesta Flow Rate in Lesser Mouse Deer (*Tragulus javanicus*) (Oleh : Darlis) 149
- ✓ ▪ Daya Fertilitas Sperma Seksing Kambing Peranakan Ettawah Setelah Simpan Dingin dan Simpan Beku (Oleh : Enny Yuliani) 158
- Aplikasi Model Arrhenius Untuk Pendugaan Penurunan Masa Simpan Daging Sapi pada Penyimpanan Suhu Ruang dan Refrigerasi Berdasarkan Nilai T_{vb} dan ph (Oleh : Kusmajadi Suradi) 168
- Estimasi Produksi Mikroba Hasil Fermentasi Hijauan Makanan Ternak dalam Rumen Menggunakan Tehnik In Vitro (Oleh : Abdul Latief dan Saitul Fakhri) 178
- Pemanfaatan Ampas Tebu Hasil Biokonversi Jamur Tiram Putih dalam Ransum terhadap Produk Fermentasi dalam Rumen Domba Priangan Jantan (Oleh : Ana Rochana Tarmidi) 186
- Identifikasi Performans Produksi dan Service Period Sapi Pesisir dan Hasil Persilangan melalui Inseminasi Buatan di Kabupaten Pesisir Selatan Sumatera Barat (Oleh : Irwandi Sulin) 196
- Pengaruh Tandan Kosong Sawit Fermentasi, Defaunasi dan By Pass Protein Terhadap Kecernaan Ternak Domba (Oleh : Syahro Ali Akbar) 205
- Pertumbuhan, Konsumsi dan Konversi Ransum Sapi Pesisir yang Digemukakan dengan Tingkat Pemberian Ransum dan Lama Penggemukan Berbeda (Oleh : Khasrad) 215

Lang, III
1.3

Daya Fertilitas Sperma Seksing Kambing Peranakan Ettawah Setelah Simpan Dingin dan Simpan Beku

Enny Yuliani¹

Intisari

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya fertilitas spermatozoa berbagai metode pemisahan spermatozoa setelah simpan dingin dan simpan beku. Metode pemisahan yang digunakan adalah *Sentrifugasi gradien densitas percoll*, *Septadex*, *Swin up* dan kombinasi *Swin up* + *Aside Migration*. Metode yang digunakan untuk mengetahui daya fertilitas spermatozoa adalah pembuahan *in vitro*. Ovarium dikoleksi dari rumah potong hewan dan oosit dimatursasi dalam media TCM 199 dengan penambahan 10 % *Estrous Cow Serum* dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Oosit kumulus kompleks yang telah dimatangkan secara *in vitro* dilakukan fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan semen cair dan beku. Dua puluh empat jam setelah fertilisasi, presentase angka fertilitasi dapat ditentukan. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa presentase motilitas spermatozoa tidak berbeda ($P>0,05$) sebelum pembekuan. Sesudah *haawing* presentase motilitas spermatozoa pada metode *Swin up* dan *Sentrifugasi gradien densitas percoll* lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan metode filtrasi dengan *Septadex* dan metode kombinasi *Swin up* + *Aside Migration*. Berdasarkan hasil analisis Anova, menunjukkan bahwa presentase angka pembuahan, tidak berbeda ($P>0,05$) pada saat sebelum pembekuan. Sesudah *haawing* presentase angka pembuahan pada metode *Swin up* dan *Sentrifugasi gradien densitas percoll* menghasilkan angka pembuahan lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan metode *Septadex* dan metode kombinasi *Swin up* + *Aside Migration*. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka sperma seksing setelah simpan dingin dan simpan beku sangat mendukung peningkatan populasi kambing melalui inseminasi buatan.

Kata Kunci: Kambing, Sperma Seksing, Simpan Dingin dan Beku, Daya Fertilitas

Abstract

The objective of this study was to evaluate of fertilizing capacity of sexed sperm after chilled or frozen storages. The kind of separation method used were Contium percoll,

¹ Staf Pengajar Fakultas Peternakan UNRAM, Mataram

Sephadex, Swim up and Swim up + Aside Migration combination method. The method used for monitoring spermatozoa fertilizing ability was *in vitro* fertilization (IVF). Ovaries were collected from a abattoir and subsequently oocytes were matured in a TCM 199 media with a supplement 10 % estrous cow serum in a 5 % CO₂ incubator for 24 hours. Follicular bovine cumulus oocyte complexes were matured *in vitro* and *in vitro* fertilization (IVF) carried out with semen. Twenty four hours after the *in vitro* fertilization using the sperm collected from separation methods the percentage of fertilization rate was determined. The result of Anova analysis showed that the mean percentage of motility was not difference ($p>0,05$) at pre-freezing. After freezing, the mean percentage of fertilization rate in Swim Up and gradient densitas percoll were higher ($P<0,05$) than Sephadex and Swim up + that, sexed sperm after chilled or frozen storages was very supported on increasing goat population through Artificial Insemination.

Key Word: Goat, Sexing Sperm, Chilled or Frozen Storages, Fertilizing Capacity

Pendahuluan

Penerapan bioteknologi reproduksi melalui inseminasi buatan dengan menggunakan pejantan unggul merupakan upaya untuk memacu pengembangan peternakan secara efektif dan efisien dalam meningkatkan produktivitas ternak, terutama kambing lokal. Teknologi IB dapat ditingkatkan nilainya dengan menggunakan program anak yang dihasilkan mempunyai jenis kelamin sesuai keinginan, karena sangat mendukung program breeding dalam pemilihan bibit unggul. Selain itu keuntungan seksing spermatozoa mampu menunjang efisiensi pada peternakan, karena dapat menghasilkan anak dengan jenis kelamin tertentu

secara masal sesuai dengan pengembangan peternakannya.

Di dalam kepala spermatozoa terdapat sepasang kromosom yang menentukan jenis kelamin disebut kromosom seks, sisanya disebut autosom (Nalbandov, 1990). Saat pembelahan meiosis dalam proses spermatogenesis mamalia sebagian jumlah spermatozoa mempunyai kromosom X dan sebagian lagi berkromosom Y, sedangkan pada ovum semuanya berkromosom X (Hafez, 1997). Oleh karena itu jenis kelamin anak ditentukan oleh kromosom seks spermatozoa. Kemungkinan spermatozoa yang mengandung kromosom X atau kromosom Y untuk membuati ovum memiliki kemampuan yang

sama yaitu masing-masing 50%. Spermatozoa yang mengandung kromosom X (spermatozoa X) jika terjadi fertilisasi akan menghasilkan embrio betina, sedangkan spermatozoa yang mengandung kromosom Y (spermatozoa Y) akan menghasilkan embrio jantan, karena pada kromosom Y terdapat *sex determining Region Y gen* (SRY) yang menentukan terbentuknya testis pada hewan jantan (Windsor dkk. 1992; Graves, 1994; Koopman, 1995). Dengan demikian pengaturan jenis kelamin anak dilakukan dengan cara pemisahan spermatozoa bertkromosom X atau Y sebelum inseminasi (Zavos, 1997).

Kualitas sperma dapat dipertahankan dengan dilakukan pengenceran menggunakan bahan-bahan yang dapat menjamin kebutuhan fisik dan kimia spermatozoa. Prinsip dasar pengencer sperma harus mengandung unsur-unsur yang menyertai sifat fisik dan kimia sperma, tidak mengandung zat yang meracuni spermatozoa dan membatasi kemampuan fertilisasi. Selain bahan pengencer yang dipakai, teknik penyimpanan sperma juga merupakan faktor penting dalam menentukan keberhasilan pelaksanaan IB. Tujuan penyimpanan sperma adalah memperpanjang daya hidup dan kapasitas pembuahan sperma-

tozoa, yaitu dengan cara mengurangi atau menghentikan gerakan dan reaksi metabolik (Evans dan Maxwell, 1987).

Penyimpanan sperma cair kambing dalam jangka waktu 24 - 48 jam pada suhu 5°C dapat menghasilkan angka konsepsi 90% (Palad dan Medina, 1991) dan terdapat penurunan fertilitas pada inseminasi di dalam serbuk mencapai 10-30% per hari. Penyimpanan sperma dalam kemasan beku (suhu -196 °C di dalam N₂ cair) mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa sampai waktu yang tidak terbatas. Selama prosesing sperma beku, mulai dari penampungan, pengenceran, ekulibrasi dan penyimpanan dalam kontainer nitrogen cair spermatozoa mengalami serangkaian perubahan, yaitu perubahan suhu, perubahan tekanan osmotik, dan pembentukan serta pelarutan es pada lingkungan ekstraseluler (Watson 2000). Akibatnya terjadi kerusakan pada membran plasma dan akrosom, kerusakan pembungkus mitokondria dan akrosom, pelepasan berbagai enzim, penurunan lipoprotein dan asam amino, serta penurunan aktivitas proteolitik akrosom (Salamon dan Maxwell, 2000) yang dapat menyebabkan penurunan integritas fungsional, viabilitas dan kapasitas pembuahan spermatozoa.

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian tentang "Daya Fertilitas Sperma Seksing Kambing Etawah Setelah Simpan Dingin dan Simpan Beku".

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Imunobiologi UPT- MIPA Universitas Mataram. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (true perlakuan) dengan 5 kelompok yaitu metode penisahan yaitu *Coulum percoll*, *Sephadex*, *Swim up* dan Kombinasi *Swim up* dengan *Aside Migration*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Pre-Post Test Control Group Design*, pengukuran dilakukan pada waktu sebelum dan sesudah diberikan perlakuan.

Sampel penelitian diperoleh dengan cara random yang diambil dari populasi spermatozoa kambing yang berasal dari sperma segar, dengan kriteria motilitas spermatozoa setelah penampungan di atas 70 %. Komposisi bahan di dalam pengencer adalah sodium sitrat, glukosa, kuning telur, aquadesstilata, penisilin dan Streptomisin. Pembuatan sperma beku dilengkapi dengan gliserol 7 %. Penambahan bahan pengencer didasarkan pada perhitungan konsentrasi, progresif motilitas dan volume sperma dan dosis IB (125 x

10⁶). Setelah itu, sperma yang sudah diseksing dicampur dengan larutan pengencer disimpan pada temperatur 4°C -5°C (kulkas). Evaluasi atau pengamatan terhadap kualitas spermatozoa dilakukan setelah penyimpanan hari ketiga.

Proses pembekuan sperma, larutan pengencer ditambahkan gliserol sebanyak 7%. Setelah sperma yang sudah diseksing dicampur dengan larutan pengencer dimasukkan dalam straw dan diekuilibrasi selama 1,5 - 2 jam pada suhu 5°C. Selanjutnya ditempatkan pada kanister (bersama goblet), kemudian ditaruh di atas uap nitrogen cair bersuhu -130°C selama 9 menit. Setelah itu kanister dikelupkan ke dalam nitrogen cair (-196°C) untuk penyimpanan. Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan setelah simpan dingin dan straw diawing pada air dengan suhu 33°C selama 40-60 detik pada hari ke 7 setelah penyimpanan.

Daya fertilitas sperma diuji melalui fertilitasi *in vitro* dalam media EBSS (*Early Balance Salt Solution*). Proses fertilitasi dilakukan dengan cara memasukkan suspensi spermatozoa pada masing-masing perlakuan dalam cawan petri steril. Observasi osit yang telah dibuat dilakukan setelah 24 jam fertilitasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu kisaran

37°C - 38,5 °C dengan kelembaban 95-99°C.

Uji Anova pada taraf nyata 5% digunakan untuk menganalisis motilitas dan daya fertilitas spermatozoa yaitu pada tingkat perubahan setelah 24 jam fertilitasi.

Hasil dan Pembahasan Motilitas Spermatozoa Seksing Setelah Penyimpanan

Pengaruh metode seksing terhadap motilitas spermatozoa, baik sesudah seksing maupun sesudah simpan dingin (Tabel 1) belum menunjukkan perbedaan ($P>0,05$). Sesudah *thawing* terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa pada metode filtrasi dengan *Seplader* dan kombinasi *Swin up* dan *Aside Migration* lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan metode *Swin up* dan *Sentifugasi graten densitas percoll*.

Berdasarkan pengamatan motilitas spermatozoa pada semen kambing yang disimpan dingin dan beku membuktikan bahwa metode seksing dan bahan pengencer yang digunakan dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh perubahan suhu, perubahan tekanan osmotik dan pembentukan kristal-kristal es dalam lingkungan sel spermatozoa. Pengencer semen yang digunakan dalam penelitian

ini adalah sitrat kuning telur.

Komponen dasar pengencer tersebut mendukung substansi ion-ion untuk mempertahankan osmolaritas dan memproteksi medium, sumber lipoprotein untuk mencegah kejutan dingin, komponen krioprotektan untuk meminimalkan kerusakan akibat pembentukan kristal-kristal es, sumber energi dan bahan tambahan lainnya. Keunggulan sitrat ialah berkapasitas penyangga yang baik untuk mempertahankan osmolaritas karena mengandung garam dan asam amino. Fruktosa berperan menghasilkan energi berupa ATP (mengandung fosfat an organik) untuk kontraksi fibril-fibril yang dapat menghasilkan gerak spermatozoa. Penambahan gliserol dalam pengencer dimaksudkan untuk meminimalkan kerusakan akibat pembentukan kristal es intraselular.

Efek negatif yang diimbulkan bila terjadi perubahan tekanan osmotik pengencer kearah hipertonik atau hipotonik, yaitu merusak membran plasma sel spermatozoa sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu, akibatnya dapat menurunkan motilitas. Adanya perbedaan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel spermatozoa

Tabel 1. Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa dari Penampungan sampai Thawing Penyimpanan

Penampungan (80,25±0,38%) Sesudah Seksing	Motilitas (%)			
	Swim up	Percoll	Septadex	SU + ASIM
Sesudah Simpan dingin	80,50±3,33 ^a	80,34±2,35 ^a	67,24 ±0,32 ^c	69,36±1,37 ^c
(thawing kemas kembali)	50,50±2,33 ^b	50,23±2,45 ^b	30,36±0,52 ^d	32,23±2,91 ^d
Penurunan dari sesudah seksing sampai thawing	30,15±1,25 ^b	30,10±2,33 ^b	36,88±0,36 ^d	37,13±1,34 ^d

Keterangan : Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$)

menyebabkan air mengalir ke daerah yang bertekanan osmotik tinggi, dan menimbulkan gejala *osmotic shock* pada spermatozoa. Gejala *osmotic shock* menainkan peranan penting terhadap kerusakan membran sel spermatozoa dalam proses pembekuan semen, yang ditandai peningkatan spermatozoa dengan ekor melingkar, menurunnya viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa (Correa dkk., 1997). Hal inilah yang menyebabkan

penurunan kualitas pada seluruh perlakuan. Namun dengan metode seksing, pemilihan bahan pengencer dan bahan krioprotektan yang digunakan dapat memperbaiki penurunan kualitas sperma.

Daya Fertilitas Spermatozoa Seksing Setelah Penyimpanan

Daya fertilitas spermatozoa perlakuan dicerminkan dari keberhasilan tingkat pembuahan

embrio. Kriteria oosit yang berhasil dibuahi secara *in vitro* ditandai dengan terbentuknya polar bodi II, pronukleus jantan dan betina dalam sitoplasma oosit. Tingkat pembuahan setelah 24 jam fertilitasi antar kelompok perlakuan dipaparkan pada Tabel 2.

Hasil analisis menunjukkan bahwa pengaruh metode seksing terhadap daya fertilitas spermatozoa, baik sesudah seksing maupun sesudah simpan dingin tidak menunjukkan perbedaan ($P > 0,05$). Sesudah *thawing*, persentase pembuahan *in vitro* kanbiring setelah fertilitasi menggunakan sperma seksing (kemasan beku) menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Presentase pembuahan setelah 24 jam fertilitasi pada metode *Swim up* dan *Sentrifugasi gradien densitas percoll* menghasilkan angka pembuahan lebih tinggi dibandingkan *Septadex* dan kombinasi *Swim up* dan *Aside Migration*.

Tabel 2. Rataan Persentase Pembuahan *in vitro* pada Kambing Setelah Fertilisasi dengan Menggunakan Sperma Seksing (Simpan Dingin dan Kemasan Beku)

Penyimpanan	Metode Seksing			
	Swim up	Percoll	Sephadex	SU + ASM
Sesudah Seksing	65,56 ± 2,35 ^a	68,32 ± 2,37 ^a	60,22 ± 1,35 ^c	60,67 ± 1,55 ^c
Sesudah Simpan dingin	64,34 ± 3,65 ^a	66,33 ± 3,78 ^a	58,36 ± 2,39 ^c	59,56 ± 3,23 ^c
Sesudah pencairan kembali (Thawing kemasan beku)	57,65 ± 4,52 ^b	55,23 ± 2,54 ^b	50,27 ± 3,86 ^d	51,34 ± 3,56 ^d

Keterangan : nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan beda nyata ($P < 0,05$)

Kapasitasi dan reaksi akrosom merupakan tahap yang paling penting dalam proses fertilisasi baik *in vitro* maupun *in vitro*. Spermatozoa hanya dapat mengadakan reaksi akrosom, apabila telah menyelesaikan kapasitasi (Tourayne, 1994). Kapasitasi merupakan suatu proses perubahan fisiologis dan kimiawi pada bagian akrosom spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina untuk meningkatkan daya fertilisasi dan mencegah aktivasi prematur dari akrosom sebelum sperma mencapai daerah untuk fertilisasi (Hafez, 1997). Kapasitasi spermatozoa dalam proses fertilisasi *in vitro* diperlukan untuk mempersiapkan sperma mengawali fungsi reaksi akrosom dan terjadi peningkatan frekuensi untuk mendapatkan pola motilitas yang lebih cepat (hiperaktivasi). Peningkatan kualitas spermatozoa termasuk di dalamnya terjadinya

proses kapasitasi, sehingga mengakibatkan angka fertilisasi menjadi lebih tinggi secara bermakna (Yavetz *dkk.*, 1997; Correa *dkk.*, 1997). Motilitas spermatozoa sangat penting untuk keberhasilan penetrasi zona, yang diikuti dengan gerakan memotong, gerakan maju dan mundur dari kepala spermatozoa. Selama proses penembusan zona pelusida, kepala spermatozoa menerobos ruang perviteline menuju ke vitellus kemudian secara bertahap keduanya bergabung.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, spermatozoa yang diseksing dengan metode *Swim-up*, *percoll density gradient centrifugation*, *Sephadex filtration* dan kombinasi *Swim up* dengan *Aside migration* dapat menginduksi induksi kapasitasi secara *in vitro* (Yuliani, 2003). Peningkatan kapasitasi berkaitan dengan peningkatan motilitas yang disebabkan oleh adanya mekanisme media

seksing yang mempunyai kesanggupan meningkatkan konsentrasi c-AMP intraseluler untuk energi pergerakan dan adanya penekanan terbentuknya oksidan atau radikal bebas yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa.

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu, bahwa metode *Swim up* secara signifikan dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi. Meningkatnya potensi fertilisasi diakibatkan spermatozoa mempunyai motilitas yang lebih baik, morfologi normal, mengeluarkan spermatozoa rusak dan debris. Tanpa adanya sel nonspermatik dalam sperma dapat menghasilkan suatu suspeni spermatozoa dengan potensi fertilisasi tinggi (Correa dan Zavos, 1996; Yavetz dkk., 1997; Correa, dkk., 1997).

Pengenalan antara spermatozoa dengan ovum (*sperm-egg recognition*) melibatkan perlakuan membran spermatozoa dengan permukaan luar zona pelusida ovum. Dilikuti oleh terjadinya perubahan sifat membran spermatozoa yang memegang peranan penting pada reaksi fusi akrosom, untuk terjadinya fusi spermatozoa dengan ovum. Apabila terdapat kerusakan membran, akan mempengaruhi kemampuan spermatozoa untuk mengikat zona pelusida, sehingga

mengakibatkan kegagalan fertilisasi. Integritas fungsional membran spermatozoa yang baik, harus ditunjang oleh integritas struktural membran spermatozoa yang baik pula. Hal ini diakibatkan karena adanya peroksida yang merupakan produk metabolik dari enzim oksidase yang dilepaskan dari spermatozoa mati, akan berpengaruh toksik pada spermatozoa yang hidup. Spermatozoa merupakan sel yang sangat peka terhadap oksidasi, sehingga ROS akan menyebabkan penurunan viabilitas, motilitas dan morfologi spermatozoa normal. Perubahan kualitas spermatozoa tersebut akan mengurangi kemampuan fusi antara spermatozoa dan ovum, dengan kelompok kontrol.

Suatu indikasi spermatozoa fertil adalah spermatozoa yang memiliki kemampuan berpenetrasi ke dalam oosit dan membentuk pronuklei jantan. Selanjutnya kromosom pada jantan dapat bergabung dengan kromosom dari pronukleus betina untuk menghasilkan embrio dengan kemampuan hidup yang maksimal. Mekanisme potensi spermatozoa dalam perkembangan awal embrio belum banyak terungkap. Kemampuan yang dapat diterangkan berkaitan dengan kemampuan spermatozoa setelah perlakuan dalam meningkatkan angka *cleavage* embrio *in vitro* pada

kambing adalah sebagai berikut. Pembentukan kromosom paternal dan maternal pada spindel pembelahan *cleavage* pertama dapat menjadi lebih sempurna dan peran aktivitas sitoskeleton dalam mengatur perpindahan kedua pronukleus jantan dan betina menjadi lebih baik. Begitu pula terhadap kemampuan duplikasi komplemen kromatin paternal dan maternal mengalami kondensasi yang sempurna, sampai pada akhirnya kedua kromosom tersebut membentuk sebuah nukleus yang diploid. Selanjutnya akan membelah sesuai dengan tahap perkembangannya.

Kesimpulan

Metode seksing berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa dalam simpan beku, namun tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna pada simpan dingin. Sesudah *thawing* persentase motilitas spermatozoa pada metode *Swinm up* dan *Sentrifugasi gradien densitas percoll* lebih tinggi dibandingkan dengan metode filtrasi dengan *Sephadex* dan metode kombinasi *Swinm up* + *Aside Migration*. Daya fertilitas spermatozoa tidak berbeda, baik sesudah seksing maupun sesudah simpan dingin namun perbedaan akan nampak pada saat *thawing* setelah sperma di simpan dalam kemasanan beku. Presentase pen-

buahan setelah 24 jam fertilisasi pada metode *Swinm up* dan *Sentrifugasi gradien densitas percoll* menghasilkan angka pembuahan lebih tinggi dibandingkan dibandingkan dengan metode *Sephadex* dan kombinasi *Swinm up* dan *Aside Migration*.

Daftar Pustaka

- Correa, J.R and P.M. Zavos 1996. Preparation and recovery of frozen-thawed spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *J. Theriogenology* 46: 1225-1231.
- Correa, J.R; P.N. Zarnakoupis-Zavos and P.M. Zavos. 1997. Quantitative and qualitative characteristics of frozen-thawed bovine spermatozoa recovered via conventional and a standardized swim-up technique. *Tohoku J exp Med* 181(2); 267-7.
- Evans G and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butter worth. Sydney, Boston, London, Durban, Singapore, Willington.
- Graves, J.A.M. 1994. Mammalian sex determining genes. In the differences between the sexes ed by S.V. Short and

- E. Balaban. Cambridge University. Press. 397-418.
- Hafez E S E. 1997. Techniques for Improving Reproduction Efficiency: semen evaluation. In: *Reproduction in Farm Animal*. Hafez, E.S.E. (ed) sixth Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Koopman P. 1995. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammal. *Reprod. Fertil. Dev* 7 :713-722.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas (Reproduction Physiology of Mammals and Birds)*. Diterjemahkan oleh Keman, S. Edisi ketiga. Universitas Indonesia Press. Jakarta. Hal. 45.
- Palad O.A and Medina P.V. 1991. The effect of seminal plasma removal on survival of buck spermatozoa resuspended in modified illini variable temperature diluter stored at room and refrigeration temperatures. *The Phillipine agriculturist* 74:183-189.
- Salamon S and Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
- Tournaye, H. 1994. The effect of pentoxifylline on sperm function and embryonic development and its use in the treatment of male-factor infertility. Thesis. Vrije Universiteit Brussel, Belgium.
- Watson PF. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.
- Windsor D P, Evans G, White I G. (1992) Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm : A Review. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 155-171
- Yavetz H; R. Hauser R; Z.T. Honnornai ZT; C.F Paz; J.B. Lessing, A. Amit ; I. Yogev. 1997. Separation of sperm cells by sedimentation technique is not suitable for *I vitro* fertilization purposes. *Hum Reprod* 8(2):211-4
- Yuliani. E. 2003. status kapasitasi sperma beku-cair sapi Bali. *Jurnal Penelitian Untrani* Volume 2 N0 3. Pebruari 70-78.
- Zavos, P.M. 1997. Preparation of human Frozen -thawed seminal specimens using the spermprep filtration method improvements over the conventional swim-up method. *J.Fertil Steril* , 57:1326-1330.