

Kajian Viabilitas Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dengan Pemberian Fosfolipid

*(Study of the Viability of Spermatozoa before and After Percoll Gradient Density
Centrifugation with the Administration of Phospholipids)*

Laurentius Anthony Setiono*, Rooije Roogers H Rumende, Lalu Wahyudi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Program Studi Biologi, Jurusan Biologi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

*Email korespondensi: 18101102066@student.unsrat.ac.id

(Article History: Received Juli 5, 2022; Revised July 20, 2022; Accepted August 30, 2022)

ABSTRAK

Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP) merupakan metode sexing yang digunakan untuk memisahkan spermatozoa X dan Y untuk mencari jenis kelamin anak yang diharapkan. Namun, metode SGDP yang digunakan sering kali dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan efek sentrifugasi gradien densitas percoll terhadap spermatozoa dan mendeskripsikan efek pemberian fosfolipid sebelum dan sesudah sentrifugasi gradien densitas percoll. Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian pustaka, dimana penelitian didasari pada sumber-sumber literatur yang dikumpulkan untuk menunjang dalam menyelesaikan permasalahan dan tujuan penelitian yang dilakukan. Hasil penelitian yang diambil dari beberapa pustaka menunjukkan bahwa pemberian fosfolipid pada saat sentrifugasi, dapat mempertahankan kualitas dari spermatozoa. Hal ini karena fosfolipid dapat menjaga membran dari spermatozoa.

Kata kunci: Fosfolipid; Sentrifugasi; SGDP; Spermatozoa

ABSTRACT

Percoll Density Gradient Centrifugation (PDGC) is a sexing method used to separate X and Y spermatozoa to find the sex of the expected child. However, the SGDP method used can often cause a decrease in the quality of spermatozoa. The purpose of this study was to describe the effect of Percoll density gradient centrifugation on spermatozoa and to describe the effect of phospholipid administration before and after Percoll density gradient centrifugation. The research method used is library research, where research is based on literature sources collected to support solving problems and the objectives of the research carried out. The results of the study taken from several libraries showed that the administration of phospholipids at the time of centrifugation, can maintain the quality of spermatozoa. This is because phospholipids can protect the membranes of spermatozoa.

Keywords: Centrifugation; SGDP; Spermatozoa; Phospholipid

PENDAHULUAN

Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP) merupakan salah satu teknik atau metode yang biasa dipakai dalam pemisahan spermatozoa yang didasari pada perbedaan spermatozoa X dan Y (Susilawati *et al.* 2017).

Metode sentrifugasi gradien densitas percoll memang sudah banyak sekali digunakan dan terbukti efisien, namun terdapat faktor-faktor yang menjadi 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 akan menyebabkan viabilitas dan motilitas spermatozoa menurun (Rasad *et al.* 2019). Viabilitas merupakan daya hidup dari spermatozoa. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa biasanya dijadikan sebagai indikator integritas struktur membran spermatozoa (Prastika *et al.* 2018).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah kerusakan membran pada spermatozoa adalah dengan melakukan pengenceran. Metode sentrifugasi gradien densitas percoll bisa dilakukan pengenceran salah satunya menggunakan Fosfolipid. Pengenceran yang dilakukan dapat menjaga kualitas spermatozoa dan mempertahankan membran spermatozoa. Fosfolipid sendiri merupakan salah satu pengencer yang membentuk lapisan luar membran sel dan berperan penting dalam melindungi membran spermatozoa (Pamungkas dan Krisnan 2017). Penulisan ini bertujuan untuk mendeskripsikan kualitas spermatozoa sebelum dan sesudah sentrifugasi gradien densitas percoll dengan pemberian fosfolipid dari hasil-hasil penelitian.

METODE

Metode penelitian yang digunakan secara kajian pustaka, pada penelitian ini menggunakan sumber-sumber literatur yang berasal dari jurnal-jurnal ilmiah, baik nasional atau internasional, karya-karya ilmiah, artikel laporan penelitian, dan buku-buku teks. Referensi-referensi yang berkaitan dengan viabilitas dicari dan dikumpulkan menjadi satu untuk

memperkuat pembahasan penelitian. Pencarian dilakukan dengan kata kunci sgdp, spermatozoa, dan fosfolipid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Viabilitas spermatozoa adalah kemampuan hidup spermatozoa setiap kali mengalami ejakulasi. Viabilitas dapat dikatakan normal, apabila persentase viabilitas spermatozoa mencapai >50% dan dapat dikatakan hidup bila spermatozoa tidak menyerap warna, sebaliknya dikatakan mati bila spermatozoa menyerap warna (Shaula 2019).

Dari 13 literatur yang direview menunjukkan adanya pengaruh SGDP terhadap viabilitas spermatozoa. Hal ini ditunjukkan pada penelitian Susilawati *et al.* (2017) yang menunjukkan bahwa spermatozoa yang tidak disexing memiliki hasil kualitas yang lebih baik dari spermatozoa yang disexing. Rawat dan Sharma (2019) memberikan penjelasan yang sama dengan membuktikan dengan penelitian yang didapatkan oleh mereka dengan kontrol memiliki kualitas spermatozoa yang jauh lebih baik dengan $82,50 \pm 0,96\%$. Hasil ini jauh lebih baik dari perlakuan sexing SGDP dengan nilai $27,33 \pm 0,84\%$. Hal ini memperkuat teori dari Susilawati (2014) yang menyatakan bahwa sentrifugasi dapat menyebabkan kerusakan membran pada spermatozoa. Membran yang rusak akan menimbulkan kerusakan bagi organ dalam yang ada di dalam sel spermatozoa, salah satunya mitokondria yang berfungsi untuk respirasi sel guna menghasilkan energi. Dengan terkena dampaknya, maka akan mengganggu proses metabolisme yang menyebabkan pergerakan spermatozoa akan terganggu.

Tabel 1. Hasil-hasil utama literatur yang digunakan dalam penelitian

No.	Peneliti	Pengenceran	Perlakuan	Hasil Penelitian
1.	Susilawati <i>et al.</i> (2017)	Tidak ada	Membandingkan spermatozoa kontrol dan spermatozoa hasil sexing.	Tidak disexing: 64,25± 3,94 ^b % Yang disexing: X (53± 7,93 ^a %), Y (48 ±8,28 ^a %).
2.	Rawat dan Sharma (2019)	Tidak ada	Membandingkan viabilitas Kontrol dan SGDP	Kontrol : 82,50± 0,96% SGDP: 27,33 ± 0,84%
3.	Bhat dan Sharma (2019)	Tidak ada	Sentrifugasi sebanyak 1kali dan 2 kali	Sentrifugasi 1 kali: 75,38 ± 2,24% Sentrifugasi 2 kali: 70,17±1,18%
4.	Noviandi (2015)	Tidak ada	Sentrifugasi selama 5 dan 7 menit dengan kecepatan 2250 rpm	5 menit: Lapisan atas 49,5%; lapisan bawah 60% 7 menit: Lapisan atas 47,5%; lapisan bawah 56,5%
5.	Jannati (2019)	Tidak ada	Membandingkan kecepatan sentrifugasi 500 rpm, 1000 rpm, 1500 rpm, dan 2000 rpm	Kecepatan sentrifugasi terbaik pada 2000 rpm dengan persentase X (77,08%) dan Y (78,43%)
6.	Hussein (2013)	Tidak ada	Membandingkan metode sexing SGDP, Swim-up, dan kontrol	SGDP: X dihasilkan 65,8% dan Y 34,2%, total kelahiran 76 kelinci. Swim-up: X dihasilkan 25% dan Y dihasilkan 75%, total kelahiran 72 kelinci Kontrol: X dihasilkan 48,8% dan Y 51,2%, total kelahiran 82 kelinci.
7.	Bravo <i>et al.</i> (2020)	Tidak ada	Lapisan percoll digunakan dengan berbeda konsentrasi 0% (K), 45/90% (T1), 45/60 (T2)%	K : 83,2 ± 2,04% T1: 92 ± 2,91% T2: 89 ± 2,88%
8.	Rumende <i>et al.</i> (2022)	Fosfolipid 10%+EGTA Ca ²⁺ free buffer (0.5 mM, 1 mM, dan 2 mM)	Kecepatan 2250 rpm selama 5 menit pada sentrifugasi pertama. Kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada sentrifugasi kedua. Membandingkan viabilitas kontrol(A) dan Fosfolipid 10%+EGTA Ca ²⁺ free buffer 0.5mM(B), 1 mM(C), 2 mM(D).	Viabilitas A: 63,55% B: 85,75% C: 91,79% D: 94,13%

9.	Fatahillah <i>et al.</i> (2016)	CEP-2+10% kuning telur	SGDP selama 5 menit dan 7 menit	Sentrifugasi 5 menit: Lapisan atas: 89,39 ± 4,20% Lapisan bawah: 88,16 ± 4,39% Sentrifugasi 7 menit: Lapisan atas: 88,75 ± 3,34% Lapisan bawah: 87,63 ± 3,05%
10.	Muhammad <i>et al.</i> (2016)	CEP-2+KT 10%,15%,dan 20%	Perbandingan konsentrasi KT terbaik Viabilitas Spermatozoa selama 6 hari penyimpanan	P1 (KT 10%): 75,50% P2 (KT 15%): 75,51% P3 (KT 20%): 78,91%
11.	Lele <i>et al.</i> (2017)	Pengencer andromed dan tris aminomethan	Sexing dengan menggunakan pengencer yang berbeda	Andromed : Lapisan bawah: 53,40± 0,03% Lapisan atas: 60,31 ± 0,14% Tris aminomethan: Lapisan bawah: 74,41 ± 0,19% Lapisan atas: 75,65 ± 0,06%
12.	Safitri <i>et al.</i> (2018)	Tris kuning telur dan susu skim kuning telur	Perbedaan viabilitas spermatozoa dalam penyimpanan	Tris kuning telur: 77,44 ± 4,26 ^b % Susu skim kuning telur: 73,56 ± 3,32 ^a %
13.	Masyitoh <i>et al.</i> (2018)	Tris kuning telur dan susu skim kuning telur	Perbedaan viabilitas spermatozoa <i>before freezing</i>	Tris kuning telur: 72,22% Susu skim kuning telur: 67,78%

Pada penelitian Bhat dan Sharma (2019) menjelaskan bahwa banyaknya sentrifugasi dapat mengurangi viabilitas spermatozoa. Hasil data menunjukkan bahwa spermatozoa yang disentrifugasi satu kali memiliki viabilitas yang lebih tinggi 75,38% dibanding yang disentrifugasi 2 kali 70,17%. Penelitian Noviandi (2015) menjelaskan bahwa semakin lama waktu sentrifugasi, maka kualitas spermatozoa juga akan semakin menurun. Hal ini dilihat dari hasil data penelitian yang menunjukkan bahwa sexing selama 5 menit memiliki nilai kualitas viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi daripada 7 menit.

Penelitian Jannati (2019) menjelaskan bahwa kecepatan sentrifugasi yang paling optimal untuk dilakukan adalah 2000 rpm dari kecepatan sentrifugasi 500 rpm, 1000 rpm, dan 1500 rpm. Penelitian Hussein (2013), menjelaskan bahwa spermatozoa yang tidak disexing atau kontrol memiliki jumlah kelahiran kelinci yang lebih banyak dibandingkan dengan metode sexing SGDP dan Swim-up. Proses sentrifugasi menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat dari kerusakan membran yang nantinya akan mempengaruhi

proses fisiologi dari spermatozoa (Zanella *et al.* 2016).

Bravo *et al.* (2020) mengatakan bahwa sentrifugasi dengan menggunakan percoll dapat meningkatkan kualitas dari spermatozoa salmon Atlantik. Hal ini dibuktikan dari hasil yang didapatkannya dengan melakukan sexing dengan metode sgdp dengan percoll yang memiliki konsentrasi yang berbeda. Hasilnya tentu percoll yang memiliki konsentrasi 45/90% memiliki nilai yang lebih tinggi daripada percoll yang memiliki konsentrasi 45/60%. Pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi lebih baik dilakukan pada waktu yang cepat, karena untuk menghindari gesekan akibat sentrifugasi dan terjadinya difusi medium pengencer ke dalam spermatozoa (Hafez dan Hafez 2008).

Rumende *et al.* (2022) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa penggunaan Fosfolipid 10% + EGTA Ca²⁺ free buffer menghasilkan viabilitas yang lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Hal ini dikarenakan peran bersama yang dilakukan oleh fosfolipid dan EGTA Ca²⁺ menunjukkan bahwa membran dari spermatozoa tetap stabil dan bisa berfungsi dengan baik yang dikarenakan fosfolipid PC menjaga dan melindungi membran dari spermatozoa, termasuk struktur bagian tubuh dan proses metabolisme, sedangkan EGTA Ca²⁺ free buffer berfungsi sebagai yang memungut ion Ca²⁺ ekstraseluler dan intraseluler. Sinkronisasi dari peran fosfolipid PC dan EGTA Ca²⁺ free buffer ini mengurangi atau mengurangi kerusakan matriks ekstraseluler dan menggantikan sistem ion regulasi di dalam membran spermatozoa yang disebabkan karena proses sentrifugasi.

Hasilnya, membran berfungsi dengan baik dan pada akhirnya kualitas spermatozoa tetap terjaga dan bahkan meningkat.

Penelitian Fatahillah *et al.* (2016) menunjukkan bahwa lamanya waktu sentrifugasi akan mempengaruhi kualitas dari spermatozoa. Hal ini dapat dilihat pada data, dimana sentrifugasi dengan waktu 5 menit memiliki kualitas viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan yang 7 menit. Lapisan atas dan lapisan bawah memiliki perbedaan jarak. Jarak untuk menembus pada lapisan bawah lebih jauh sehingga motilitas lapisan bawah lebih sedikit dari lapisan atas. Selama menempuh jarak tersebut, spermatozoa membutuhkan energi. Kebutuhan energi yang tidak cukup akan menurunkan motilitas dari spermatozoa (Saili 1999). Penelitiannya menggunakan pengencer CEP-2+10% kuning telur, sehingga didapatkan nilai viabilitas dengan sentrifugasi 5 menit 89,39% lapisan atas dan 88,16% lapisan bawah. CEP-2+10% kuning telur mampu menyediakan lingkungan yang baik dan dapat melindungi membran spermatozoa (Yamashiro *et al.* 2006).

Muhammad *et al.* (2016) di dalam penelitiannya menemukan bahwa persentase kuning telur yang digunakan, dapat mempengaruhi persentase viabilitas spermatozoa selama penyimpanan. Dalam hal ini, konsentrasi telur dengan 20% pada pengencer CEP-2 mampu mempertahankan kualitas spermatozoa dibanding dengan konsentrasi kuning telur di bawah 20% (Dasrul *et al.* 2013). Fosfolipid yang ada di dalam kandungan kuning telur mampu berasosiasi dengan membran spermatozoa, sehingga fosfolipid memiliki peran yang penting dalam

fase transisi lipid selama terjadi perubahan suhu (Zeron *et al.* 2002).

Lele *et al.* (2017), menjelaskan bahwa pengencer tris aminomethan lebih baik dari pada pengencer andromed. Hal ini disebabkan karena kuning telur mengandung lipoprotein dan fosfolipid yang dapat melindungi integritas membran spermatozoa (Kusumawati 2015). Viabilitas yang menggunakan pengencer tris aminomethan memiliki perbedaan nyata dari pengencer andromed secara analisis statistik. Safitri *et al.* (2018) dan Masyitoh *et al.* (2018) bersama-sama membuktikan bahwa pengencer tris kuning memiliki kandungan kuning telur yang tinggi dibanding pengencer susu skim, yang bisa melindungi dan menjaga viabilitas spermatozoa lebih baik. Kandungan kuning telur yang mengandung fosfolipid, yang merupakan salah satu komponen penyusun lipoprotein dan lesitin sebagai fosfatidilkolin, membungkus membran untuk mempertahankan konfigurasi normal dari fosfolipid bilayer yang merupakan susunan utama membran spermatozoa. Kandungan tersebut yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa (Mumu 2009; Futino *et al.* 2010).

Pemberian fosfolipid akan meningkatkan sintesis lipid membran pada retikulum endoplasma sehingga terjadi peningkatan struktur membran spermatozoa (Hegner 1976). Hal ini akan menyebabkan jumlah membran spermatozoa yang baik meningkat dan akan membuat persentase viabilitas spermatozoa meningkat (Hafez 1980). Fosfolipid yang terbentuk dari sintesis lipid akan menuju ke membran organel sel lain. Mekanisme pergerakannya ada dua, yaitu (1) *membrane budding*, vesikel membran retikulum endoplasma yang berisi

fosfolipid menjulur ke luar membentuk tonjolan dan selanjutnya berfusi dengan membran organel sel lain. (2) *phospholipid exchange protein*, protein yang larut dalam air dapat mengikat fosfolipid dari satu membran retikulum endoplasma dan melepaskannya pada membran lai atau organel lain (Darnell *et al.* 1990; Lodish *et al.* 2002; Daleke dan Lyles 2000; Henneberry *et al.* 2002).

Pemberian fosfolipid yang dilanjutkan dengan proses SGDP, akan berperan sebagai mempercepat pembentukan sintesis membran lipid pada sel dan ketika fosfolipid berada di permukaan sel, akan terjadi difusi ke dalam sel melalui peran enzim flipase yang akan berperan memindahkan ke sel yang membutuhkan fosfolipid (Lodish *et al.* 2002; Pomorski dan Menon 2006; Chang *et al.* 2004; Graham 2004).

KESIMPULAN

Berdasarkan literatur yang sudah direview, didapatkan kesimpulan bahwa sentrifugasi gradien densitas percoll dapat memisahkan spermatozoa kromosom X dan kromosom Y. Namun, penggunaan metode SGDP dapat mengakibatkan penurunan viabilitas spermatozoa. Pengenceran dengan menggunakan fosfolipid dapat menjaga atau mengurangi kerusakan yang diakibatkan dari sentrifugasi pada saat sexing.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhat Y, Sharma M (2019) X-sperm enrichment of bovine semen by percoll density gradient method and its effect on semen quality, sex ratio, and conception rate. *Indian Journal of Animal Research* 1-7.
- Bravo W, Dumorne K, Lissabet JB, Jara-Seguel P, Romero J, Farias

- JG, Risopatron J, Valdebenito I, Figueroa E (2020) Effects of selection by the percoll density gradient method on motility, mitochondrial membrane potential and fertility in a subpopulation of atlantic salmon (*Salmo salar*) testicular spermatozoa. *Journal of Animal Reproduction Science* 216.
- Chang QI, Gummadi SN, Menon AK (2004) Chemical modification identifies two populations of glycerophospholipid flippase in rat liver er. *American Chemical Society Published on Web* 43: 10710-10718.
- Daleke DL, Lyles JV (2000) Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486:108–127.
- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990) *Molecular cell biology*, 2nd edition. *Sci. Am. Books*, pp 491 – 527.
- Dasrul, Yaman MA, Zulfan (2013) Pemisahan spermatozoa berkromosom x dan y kambing boer dan aplikasinya melalui inseminasi buatan untuk mendapatkan jenis kelamin anak sesuai harapan. *Agripet* 13 (1): 6-15.
- Fatahillah, Susilawati T, Isnaini N (2016) Pengaruh lama sentrifugasi terhadap kualitas dan proporsi spermatozoa x-y sapi limousin hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer cep-2+10 % kt. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1): 86-97.
- Futino D, Mendes M, Matos W, Mondadori R, Lucci C (2010) Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animal* 45: 214–220.
- Graham TR (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends in Cell Biology* 14(12).
- Hafez ESE (1980) The semen. In Hafez ESE (eds) *Human reproduction, conception and contraception*. 2nd edition. Hegerstown, Haerper and Row, pp 99-103.
- Hafez ESE, Hafez B (2008) X and Y chromosome - bearing spermatozoa in animal reproduction in farm animal. 7th Edition Black well, pp 390-393.
- Hegner D (1976) Effect of essential phospholipids on the atpases and on the fluidity of liver plasma membrane. With compliments of *Phytophospholipid (PPL)*, pp 87-95.
- Henneberry AL, Wright MM, McMaster CR (2002) The major sites of cellular hospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Moleculer Biology Cell* 13: 3148–3161.
- Jannati EW (2019) Pengaruh perbedaan kecepatan sentrifugasi terhadap pemisahan spermatozoa ikan betok (*Anabas testudineus*). Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kusumawati (2015) Sexing spermatozoa kambing. Penerbit Media Nusa Creative.
- Lele YU, Kusumawati ED, Krisnaningsih ATN (2017) Motilitas dan viabilitas spermatozoa semen sexing kambing peranakan etawa (pe) menggunakan metode sedimentasi putih telur dengan pengencer yang berbeda. *Jurnal Sains Pertenakan* 5 (1): 50-56.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Kreiger, Scott, Zipursky, Darnell

- (2002) *Molecular cell biology*, pp 743-750.
- Masyitoh H, Suprayogi TW, Praja RN, Srianto P, Madyawati P, Saputro AL. (2018) Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing sapera dalam pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur before freezing. *Jurnal Medik Veteriner* 1(3): 105-112.
- Muhammad D, Susilawati T, Wahjuningsih S (2016) Pengaruh penggunaan cep-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi fh (*frisian holstein*) kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5°C. *Jurnal Ternak Tropika* 17 (1): 66-76.
- Mumu MI (2009) Viabilitas semen sapi simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *Journal Agroland* 16(2): 172-179.
- Noviandi A (2015) Pengaruh lama sentrifugasi terhadap kualitas semen sexing sapi simental setelah pendinginan. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang
- Pamungkas FA, Krisnan R (2017) Pemanfaatan sari kedelai sebagai bahan pengencer pengganti kuning telur untuk kriopreservasi spermatozoa hewan. *Jurnal Litbang Pertanian* 36(1): 21-27.
- Pomorski T, Menon AK (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and Molecular Life Science* 63: 2908-2921.
- Prastika Z, Susilowati S, Agustono B, Safitri E, Fikri F, Prastiya RA (2018) Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi rambon di desa Kemiren Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner* 1(2): 38-42.
- Rawat M, Sharma M (2019) Effect of percoll density gradient separation of x and y sperm on buffalo bull semen quality. *Journal of Experimental Zoology India* 23(1).
- Rumende RRH, Baideng EL, Rares FES, Rares LM (2022) Analysis of spermatozoa quality using percoll density gradient centrifugation through the administration of phospholipid + egta. *Journal of Applied Life Sciences and Environment* 54(3): 298-309.
- Saili T (1999) Efektifitas penggunaan albumin sebagai medium separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom x dan y pada sapi. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Shaula V (2019) Pengaruh ekstrak daging biji kara benguk (*mucuna pruriens*) terhadap spermatozoa studi eksperimental terhadap mencit balb/c yang mendapat paparan asap rokok. Ungraduate Tesis. Universitas Islam Sultan Agung. Semarang
- Susilawati T (2014) Sexing spermatozoa. Universitas Brawijaya Press. Malang
- Susilawati T, Kusumawati ED, Isnaini N, Yekti APA, Sudarwati H, Ridhowi A (2017) Effect of sexing process using percoll density gradient centrifugation and frozen on motility and damage to spermatozoa membrane of filial ongole. Atlantis Press. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K, Terada T (2006) Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Reproduction and Development* 52 (3): 407-414
- Zanella E, Zanella R, Poetini MR, Marques MG, Soares JCM (2016) Oxidative status of boar semen

during storage. *American Journal Biochemical Biotechnology* 12: 95-101

Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav V (2002) The Effect of liposome on thermotropic membrane phase

transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Journal of Cryobiology* 45(2): 143-152.