



THE EFFECT OF MEDIA PH AND INCUBATION TIME COMBINATION ON SPERM HEAD LENGTH, WIDTH AND AREA OF SEXING RESULTS

M. Rangga Katar Ibrahim, Nurcholidah Solihati, Rangga Setiawan

Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran

Korespondensi : rangga21001@mail.unpad.ac.id

ABSTRACT

Sperm sexing swim up method is the easiest and most economical process of separating spermatozoa X and Y. This study aims to determine the effect of the combination of medium pH and incubation duration on the morphometry of X-Y chromosome carrier sperm in goats as a result of sexing. This study used a complete random design with six treatments combining pH and incubation duration, namely P1 (6.2-40), P2 (6.8-40), P3 (7.4-40), P4 (6.2-60), P5 (6.8-60), P6 (7.4-60), each treatment was repeated 5 times. The research data was analyzed using variant analysis with Statplus software. The results showed a minimum and maximum average length of 7.49 ± 0.05 and $10.03 \pm 0.11 \mu\text{m}$, and a width of 3.54 ± 0.07 and $5.37 \pm 0.05 \mu\text{m}$. The results showed that the combination of medium pH and incubation length had no significant effect on X-Y morphometry in the upper and lower layers ($F_{hit} \leq F_{0.05}$). It was concluded that the treatment had the same effect.

Keywords : pH medium, incubation time, resiquimod (R848), morphometry, sexing sperm.

Pendahuluan

Peternakan kambing perah memiliki peran dalam mendukung pertumbuhan perekonomian daerah. Beternak kambing perah memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan, karena susu kambing memiliki khasiat yang diyakini masyarakat dapat meredakan atau menyembuhkan penyakit pada pernapasan karena kandungan nutrisinya. Salah satu jenis kambing yang memiliki keunggulan yang baik yaitu kambing betina jenis Sapera, kambing ini merupakan hasil dari persilangan antara kambing betina jenis Peranakan Etawa (PE) dengan kambing jantan jenis Saanen (Anggraeni *et al.*, 2020). Keunggulan dari kambing Sapera ini yaitu sifat yang mudah untuk beradaptasi terhadap iklim yang ada di Indonesia, sehingga sangat mudah untuk dibudidayakan di wilayah Indonesia (Saputro *et al.*, 2022).

Kambing betina pada suatu peternakan sangat berperan penting dalam meningkatkan penghasilan peternak seiring dengan bertambahnya produksi susu dan keturunan hasil perkawinan, sehingga populasi indukan betina pada peternakan kambing perah harus ditingkatkan melalui perkawinan buatan yang terarah agar dapat menghasilkan keturunan ternak betina yang unggul sebagai calon indukan. Upaya yang dapat dilakukan dalam meningkatkan peluang

untuk mendapatkan jenis kelamin tertentu sesuai dengan tujuan peternakan dan dapat meningkatkan efisiensi usaha yaitu dengan penggunaan semen hasil *sexing*. *Sexing* spermatozoa merupakan cara yang digunakan dalam mengubah jumlah rasio perolehan spermatozoa pembawa kromosom X atau Y yang dapat merubah proporsi alaminya yaitu 50:50 (Sudarma *et al.*, 2014). Salah satu metode *sexing* spermatozoa yaitu mampu memproses semen dengan jumlah besar, teknik lebih sederhana dan murah dengan hasil pemisahan spermatozoa X dan Y lebih dari 50% (Hou *et al.*, 2024).

Tingkat persentase keberhasilan proses *sexing* dengan metode *swim up* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pengontrolan derajat keasaman (pH) media *sexing*, lama waktu inkubasi dan penambahan bahan resiquimod (R848) untuk membantu proses pemisahan. Secara alamiah proses seleksi spermatozoa terjadi di dalam vagina ternak akibat dari kondisi vagina yang tidak ideal bagi salah satu spermatozoa X atau Y. Lingkungan semen yang terlalu asam atau basa sangat berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa, idealnya ada pada pH 6,2-7,4 (Bili *et al.*, 2023; He *et al.*, 2021). Faktor inkubasi akan berpengaruh terhadap hasil proporsi seperti inkubasi yang cepat akan menghasilkan proporsi semen X

dan Y yang sedikit, sebaliknya jika terlalu lama akan mengakibatkan kerusakan sel sperma meningkat dan akan berakibat menurunnya kualitas spermatozoa (Yusrina *et al.*, 2018). Penggunaan senyawa resiquimod (R848) yaitu untuk memberikan daya pengikatan pada *toll-like receptor 7/8* (TLR7/8) yang dapat menurunkan produksi dari Adenosin Tri Fosfat (ATP) dan fungsi dari mitokondria akibat dari kemampuannya dalam mengatur *glycogen synthase kinase* (GSK3) α/β -heksokinase secara terbatas hanya pada sperma X, tanpa mempengaruhi sperma Y, sehingga sperma X akan tertahan di lapisan bawah (Hou *et al.*, 2024).

Tingkat keberhasilan proses *sexing* dapat dilihat dari morfometri spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada setiap lapisan. Hal tersebut sangat menarik untuk diketahui dan dianalisa lebih lanjut oleh peneliti terkait hasil dari tingkat keseragaman morfometri spermatozoa X dan Y tertinggi pada perlakuan pH media berbeda pada setiap lapisan hasil *sexing* dengan metode *swim up* pada media tris sitrat berbasis resiquimod (R848) yang diinkubasi selama 40 dan 60 menit.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimental laboratoris. Rancangan percobaan yang dipakai pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 5 kali pengulangan. Perlakuan yang diberikan berupa kombinasi pH media dan lama inkubasi yaitu P1 (6,2-40), P2 (6,8-40), P3 (7,4-40), P4 (6,2-60), P5 (6,8-60), dan P6 (7,4-60). Objek pada penelitian ini yaitu lima ejakulat semen segar yang berasal dari 1 ekor kambing Sapera yang berumur 3 tahun yang diberi pakan sebanyak 3 kg pakan hijauan segar, 280 gram konsentrat dan 3 kg silase jagung, serta pemberian minum secara *ad libitum*. Penelitian ini dilaksanakan di Kandang Penelitian dan Praktikum Domba dan Kambing Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran untuk melakukan penampungan semen, sedangkan untuk proses evaluasi dan eksperimental semen dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang, Kecamatan Jatina-*ngor*, Kabupaten Sumedang, Provinsi Jawa Barat.

Tahapan penelitian ini dimulai dari penampungan semen, pemeriksaan semen secara makrosko-

pis dan mikroskopis, pembuatan media tris sitrat, penambahan resiquimod (R848) ke dalam media tris sitrat, *sexing* dengan metode *swim up* (memasukan semen dengan mikropipet ke dasar tabung reaksi yang telah diisi dengan 3 ml media tris sitrat dan resiquimod) dan pengamatan parameter. Parameter yang diamati yaitu morfometri sperma X-Y pada lapisan atas dan bawah. Perhitungan morfometri dilakukan dengan cara melihat menggunakan bantuan aplikasi DP2-BSW yang dihubungkan dengan mikroskop Olympus. Rumus yang digunakan untuk perhitungan Luas Kepala Spermatozoa (LKS) yaitu menggunakan rumus yang diperoleh dari spermatozoa semen segar dengan mengukur polygon yang menerapkan metode integral dan regresi, lalu dibandingkan dengan ukuran panjang dan lebar kepala sperma sebagai penetapan faktor koreksi dalam pengukuran (Saili, 1999).

$$LKS = (0,7961 \times P \times L) - 0,7939$$

Keterangan:

LKS = Luas Kepala Spermatozoa

0,7961 = Faktor koreksi

P = Panjang kepala spermatozoa

L = Bagian terlebar kepala spermatozoa

0,7939 = Nilai konstanta

Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Segar Kambing Sapera

Pengamatan semen segar secara makroskopis dan mikroskopis ini bertujuan untuk mengetahui kualitasnya agar dapat dijadikan sebagai objek percobaan. Hasil pemeriksaan semen segar kambing Sapera pada penelitian ini tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan semen segar kambing Sapera

Parameter	Rataan
Makroskopis	
Volume (ml)	0,86 ± 0,08
Warna	Krem
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
pH	6,5 ± 0,00
Mikroskopis	
Gerakan massa	+++
Konsentrasi Sperma Total (10^7 sel/ml)	273 ± 20,69
Motilitas (%)	82,95 ± 1,90

Berdasarkan pengamatan semen segar secara makroskopis didapatkan beberapa hasil berupa volu-

me, warna, bau, konsistensi dan pH semen dengan hasil rata-rata berturut-turut yaitu $0,86 \pm 0,08$ ml, krem, khas, kental, dan pH 6,5. Volume semen segar pada penelitian ini sedikit lebih rendah akibat umur kambing yang lebih tua dari dua penelitian yang telah dilaporkan dengan hasil semen yang dihasilkan yaitu 1,07 dan 0,94 ml (Masyitoh *et al.*, 2018; Saputro *et al.*, 2022). Perbedaan kualitas semen dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi pada pakan, umur, genetik, kondisi lingkungan (suhu dan musim), kesehatan, ukuran testis, bangsa, dan frekuensi ejakulasi ternak (Ristiani *et al.*, 2020).

Warna dan bau semen segar pada penelitian ini termasuk kedalam kategori normal (krem) dengan bau khas (prengus), serta memiliki konsistensi semen yang termasuk kedalam kategori kental. Konsistensi semen yang kental berkaitan dengan konsentrasi spermatozoa yang tinggi dan warna semen akan semakin krem (Masyitoh *et al.*, 2018). Warna dan aroma semen dapat dijadikan sebagai indikator semen yang terkontaminasi seperti adanya warna merah akibat darah dan beraroma anyir, semen yang tercampur urin akan berwarna kuning dan beraroma urin, semen yang berwarna coklat akibat tercampur nanah dari luka saluran reproduksi dan akan beraroma busuk, sedangkan semen normal akan berwarna krem akibat konsistensi yang kental dan memiliki konsentrasi spermatozoa tinggi dan beraroma prengus (Mugiyati *et al.*, 2017; Pramesthi *et al.*, 2015). Derajat keasaman (pH) semen segar pada penelitian ini yaitu 6,5. pH yang berubah pada semen diakibatkan oleh kematian spermatozoa yang menimbulkan pertambahan asam laktat sebagai produk akhir meta-

bolisme anaerob, pH normal semen pada kambing Sapera yaitu 6,4-6,8 (Hidayati *et al.*, 2018; Iskandari *et al.*, 2020; Sirat *et al.*, 2025).

Hasil yang didapatkan dari pemeriksaan makroskopis penelitian ini yaitu gerakan massa +++, rata-rata motilitas $82,95 \pm 1,90$, dan konsentrasi sperma total $273 \pm 20,69 \times 10^7$ sel/ml. Pengujian mikroskopis semen segar pada penelitian terdahulu didapatkan hasil berupa 85% motilitas, konsentrasi spermatotal sebanyak 3.455×10^6 , gerakan massa +++, dan abnormalitas 2-3% (Hidayati *et al.*, 2018; Masyitoh *et al.*, 2018; Saputro *et al.*, 2022). Adanya perbedaan hasil penelitian diakibatkan adanya pengaruh perbedaan aspek fisiologi, kedewasaan seksual, pertumbuhan tubuh dan kesehatan reproduksi ternak (Sholikhah & Dinasari, 2021).

Morfometri Spermatozoa X dan Y Kambing Sapera pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah

Hasil dari pengukuran morfometrik spermatozoa *sexing* berupa nilai minimal dan maksimal pada beberapa parameter yang diukur seperti panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa yang diberikan perlakuan kombinasi pH dan lama inkubasi. Hasil data yang diperoleh dari pengamatan morfometri panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa di lapisan atas dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan pada Tabel 3 menunjukkan hasil data yang diperoleh dari pengamatan morfometri panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa di lapisan bawah. Pada dua tabel berikut juga menampilkan ukuran nilai minimal dan nilai maksimal morfometri dari sperma kambing Sapera pada lapisan atas atau bawah.

Tabel 2. Ukuran rata-rata morfometri panjang, lebar dan luas minimal dan maksimal kepala sperma kambing Sapera di lapisan atas

Ukuran	Perlakuan						
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
Panjang (μm)	Min	$7,68 \pm 0,08$	$7,58 \pm 0,08$	$7,49 \pm 0,05$	$7,72 \pm 0,11$	$7,49 \pm 0,07$	$7,57 \pm 0,06$
	Max	$9,44 \pm 0,13$	$9,38 \pm 0,08$	$9,39 \pm 0,07$	$9,43 \pm 0,09$	$9,72 \pm 0,13$	$9,66 \pm 0,09$
Lebar (μm)	Min	$3,54 \pm 0,07$	$3,62 \pm 0,05$	$3,56 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,06$	$3,61 \pm 0,04$	$3,6 \pm 0,04$
	Max	$4,99 \pm 0,06$	$5,10 \pm 0,06$	$5,01 \pm 0,06$	$4,86 \pm 0,05$	$5,11 \pm 0,10$	$5,06 \pm 0,17$
Luas (μm^2)	Min	$22,42 \pm 0,44$	$22,63 \pm 0,50$	$21,52 \pm 0,36$	$23,03 \pm 0,65$	$22,12 \pm 0,26$	$21,82 \pm 0,44$
	Max	$34,92 \pm 0,55$	$35,89 \pm 0,75$	$35,03 \pm 0,61$	$34,24 \pm 0,45$	$37,46 \pm 1,28$	$37,15 \pm 1,80$

Keterangan: P1 = pH 6,2 (asam) + Inkubasi 40 Menit; P2 = pH 6,8 (netral) + Inkubasi 40 Menit; P3 = pH 7,4 (basa) + Inkubasi 40 Menit; P4 = pH 6,2 (asam) + Inkubasi 60 Menit; P5 = pH 6,8 (netral) + Inkubasi 60 Menit; P6 = pH 7,4 (basa) + Inkubasi 60 Menit

Tabel 3. Ukuran rata-rata morfometri panjang, lebar dan luas minimal, serta maksimal kepala sperma kambing Sapera di lapisan bawah

Ukuran		Perlakuan					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
Panjang (μm)	Min	7,94 \pm 0,10	7,83 \pm 0,08	7,79 \pm 0,04	7,99 \pm 0,07	7,91 \pm 0,13	7,88 \pm 0,09
	Max	9,81 \pm 0,08	9,93 \pm 0,14	9,88 \pm 0,08	10,03 \pm 0,11	9,85 \pm 0,07	9,98 \pm 0,13
Lebar (μm)	Min	3,97 \pm 0,06	3,78 \pm 0,03	3,94 \pm 0,07	3,83 \pm 0,06	3,85 \pm 0,06	3,97 \pm 0,06
	Max	5,35 \pm 0,09	5,37 \pm 0,05	5,30 \pm 0,04	5,28 \pm 0,08	5,33 \pm 0,04	5,36 \pm 0,08
Luas (μm^2)	Min	25,87 \pm 0,33	24,10 \pm 0,60	24,74 \pm 0,69	25,21 \pm 0,57	24,31 \pm 0,67	25,32 \pm 0,37
	Max	39,74 \pm 1,12	39,27 \pm 0,80	37,98 \pm 0,36	39,58 \pm 0,82	39,75 \pm 0,70	39,86 \pm 1,04

Keterangan: P1 = pH 6,2 (asam) + Inkubasi 40 Menit; P2 = pH 6,8 (netral) + Inkubasi 40 Menit; P3 = pH 7,4 (basa) + Inkubasi 40 Menit; P4 = pH 6,2 (asam) + Inkubasi 60 Menit; P5 = pH 6,8 (netral) + Inkubasi 60 Menit; P6 = pH 7,4 (basa) + Inkubasi 60 Menit

Berdasarkan hasil analisis ragam (ANOVA) terhadap ukuran minimal dan maksimal panjang, lebar, dan luas kepala spermatozoa menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi pH media dan lama inkubasi baik di lapisan atas ataupun di lapisan bawah juga tidak berpengaruh nyata terhadap morfometri baik panjang, lebar dan luas kepala sperma ($F_{hit} \leq F_{0,05}$). Pengaruh kombinasi pH media dan lama inkubasi pada penelitian ini tidak memberikan perubahan pada ukuran kepala spermatozoa, namun ukuran luas kepala spermatozoa pada lapisan atas cenderung lebih kecil dibandingkan dengan lapisan bawah. Tidak adanya perubahan pada kepala spermatozoa ini diakibatkan oleh utuhnya bagian intraseluler, adanya perubahan dimensi kepala spermatozoa terjadi ketika proses kriopreservasi dilakukan, hal ini diakibatkan oleh terjadinya proses dehidrasi progresif spermatozoa, meningkatnya akrosom yang rusak dan hilang isi akrosomnya, adanya perubahan struktur kromatin sperma dan kehilangan fungsi membran plasma, sehingga pada sperma hidup tidak akan kehilangan bagian intraseluler dan akan tetap dengan dimensi ukuran yang sama (Marco-Jiménez et al., 2006). Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian terdahulu bahwa mengukur perbedaan morfometri kepala spermatozoa X dan Y hasil *sexing* metode *swim up* dengan mempertimbangkan perbedaan jumlah DNA yang dibawa, tidak menunjukkan hasil yang berbeda secara statistik, namun ukuran pada lapisan bawah spermatozoa hasil *sexing* memiliki dimensi kepala yang lebih besar dari lapisan atas (Setiawan et al., 2024). Hasil serupa diperoleh pada *sexing* spermatozoa X dan Y kambing PE dengan sentrifugasi gradien

densitas percoll, hasil yang telah dianalisis dengan statistik menyatakan bahwa morfometri baik lapisan atas atau bawah tidak menunjukkan adanya interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi terhadap morfometri, namun pada lapisan atas memiliki ukuran luas rata-rata kepala spermatozoa yang lebih kecil dibandingkan dengan lapisan bawah (Aprila et al., 2024). Lama waktu inkubasi memberikan pengaruh nyata pada motilitas, namun tidak memberikan pengaruh pada abnormalitas spermatozoa hasil *sexing* metode BSA dengan dua waktu inkubasi, pada inkubasi 75 menit mendapatkan motilitas sebesar $25,30 \pm 2,82$ dan pada inkubasi 45 menit yang mendapatkan $33,22 \pm 3,20$ (Solihati et al., 2024).

Pada penelitian ini diperoleh ukuran yang lebih besar pada lapisan bawah yang diduga banyak spermatozoa X yang terisolasi oleh resiquimod (R848) baik pada inkubasi 40 dan 60 menit. Berdasarkan hasil dari pengukuran morfometri ini selanjutnya akan dapat mengidentifikasi sperma kromosom Y atau X, dengan dugaan sperma X akan lebih besar dari rata-rata dan sebaliknya sperma Y akan lebih kecil dari rata-rata (Solihati et al., 2017). Hasil dari penelitian ini diduga memiliki nilai persentase proporsi sperma X yang tinggi pada lapisan bawah. Pada pemisahan sperma dengan BSA diperoleh proporsi X terbaik dengan kualitas sperma tertinggi yaitu pada inkubasi 45 menit dengan hasil $75,40 \pm 3,20$ % dan motilitas $75,89 \pm 2,13$ %, dibandingkan dengan inkubasi 60 dan 75 menit (Solihati, 2017).

Perlakuan pH pada penelitian ini diduga tidak begitu mempengaruhi perubahan ukuran dimensi kepala spermatozoa, melainkan hanya mempengaruhi

pergerakannya saja, serta pH media yang digunakan juga tidak terlalu ekstrim seperti asam lemah 6,2 dan basa lemah 7,4 yang artinya masih mendekati pH optimal bagi spermatozoa (netral) (He *et al.*, 2021). pH media tidak memberikan pengaruh terhadap morfologi sperma, namun sangat mempengaruhi pada parameter kinetik, motilitas, viabilitas, dan aktivitas mitokondria (Contri *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini diperoleh ukuran morfometri panjang yang berkisar dari $7,49 \pm 0,05 \mu\text{m}$ hingga $10,03 \pm 0,11 \mu\text{m}$, ukuran morfometri lebar yang berkisar $3,54 \pm 0,07 \mu\text{m}$ hingga $5,37 \pm 0,05 \mu\text{m}$, dan untuk ukuran morfometri luas yang berkisar dari $21,52 \pm 0,36 \mu\text{m}^2$ hingga $39,86 \pm 1,04 \mu\text{m}^2$ yang hasil tersebut memiliki perbedaan sedikit dari penelitian yang telah dilaporkan, hal ini diduga akibat perbedaan rumpun kambing. Secara umum ukuran dari morfometri panjang spermatozoa berkisar antara $8,00-10,00 \mu\text{m}$ dan lebar berkisar antara $4,0-4,5 \mu\text{m}$ (Garner & Hafez, 2000). Ukuran morfometri spermatozoa pada kambing marica yaitu memiliki panjang berkisar antara $7,98-8,51 \mu\text{m}$ dan lebar $3,93-4,25 \mu\text{m}$ (Pramesthi *et al.*, 2015). Telah dilaporkan juga ukuran biometri spermatozoa pada 3 jenis kambing berbeda yaitu Peranakan Etawa (PE) memiliki panjang $8,30 \pm 0,52$ dan lebar $4,46 \pm 0,40$, kacang memiliki panjang $8,48 \pm 0,55$ dan lebar $4,79 \pm 0,44$, Sapera memiliki panjang $8,64 \pm 2,32$ dengan lebar $4,00 \pm 0,27$, dan Boer memiliki panjang $7,97 \pm 0,28$ dan lebar $4,44 \pm 0,16$ dalam μm (Lailiyah *et al.*, 2018; Zaenuri *et al.*, 2021). Ukuran morfometri luas kepala spermatozoa hasil separasi pada kambing PE di lapisan atas menunjukkan rata-rata $28,44 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$ dan di lapisan bawah menunjukkan rata-rata ukuran yang lebih besar yaitu $32,63 \pm 0,98 \mu\text{m}^2$ (Aprila *et al.*, 2024).

Setiap dimensi kepala spermatozoa yang dihasilkan kambing jantan itu sangat beragam dengan ukuran yang tidak berbeda jauh antar spermatozoanya. Pengamatan morfometri spermatozoa biasanya mengandalkan metode *Computer-Assisted Sperm Morphometry* (CASMA), namun karena metode pewarnaan dari berbagai penelitian seringkali berbeda, sehingga ketika akan membandingkan hasil antar penelitiannya akan menjadi sulit (Nagy *et al.*, 2023). Morfometri dan morfologi sperma merupakan indikator yang penting dalam tingkat kesuburan jantan, sehingga parameter ini sangat penting untuk diamati (Coward *et al.*, 2024).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat ditarik kesimpulan bahwa perlakuan kombinasi pH media (asam, netral dan basa) dengan lama inkubasi 40 menit dan 60 menit, memberikan pengaruh yang sama terhadap morfometri baik di lapisan atas atau bawah. Perlakuan dengan pH media (asam, netral dan basa) pada lama inkubasi 40 menit akan lebih baik kualitas spermatozoanya dibandingkan dengan inkubasi 60 menit, sehingga lebih disarankan untuk dipakai dilapangan.

Daftar Pustaka

- Anggraeni, A., Saputra, F., Hafid, A., & Ishak, A. B. L. (2020). Non-Genetic and genetic effects on growth traits from birth to 120 days of age of g2 Sapera goat. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 25(2), 48–59. <https://doi.org/10.14334/jitv.v25i2.2498>.
- Aprila, R., Sumaryadi, M. Y., & Nugroho, A. P. (2024). Pengaruh sentrifugasi gradien densitas percoll dan lama inkubasi terhadap morfometri dan membran plasma utuh hasil sexing spermatozoa kambing peranakan etawah. *ANGON: Journal of Animal Science and Technology*, 6(2), 187–197. <https://doi.org/10.20884/1.angon.2024.6.2.p187-197>.
- Bili, H. K., Dethan, A. A., & Tahuk, P. K. (2023). The effect of use of egg citrate-yellow threatener with young coconut water level on quality Spermatozoa of the sheep. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*, 5(1), 34–46. <https://doi.org/10.32938/jtast.v5i1.3271>.
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Valorz, C., Wegher, L., & Carluccio, A. (2013). Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science*, 136(4), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.11.008>.
- Coward, J. R., Danford, S. N., Collins, D. M., Schaffner, B.-L., Kelligrew, C., & Larkin, I. V. (2024). Comparison of different fixation and staining techniques on sperm morphometry and morphology in the Florida manatee. *Theriogenology Wild*, 5(June), 100102. <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2024.100102>.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96–109. <https://doi.org/1002/9781119265306.ch7>.

- Hidayati, B. H., Arifiantini, R. I., Karja, N. W. K., & Kusumaningrum, D. A. (2018). Kualitas semen kambing Sapera yang dibekukan dalam pengencer tris kuning telur dengan imbuhan pentoxifylline. *Jurnal Veteriner*, 19(3), 404–411. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2018.19.404>.
- He, Q., Wu, S., Huang, M., Wang, Y., & Zhang, K. (2021). Effects of diluent pH on enrichment and performance of dairy goat X / Y sperm. 9(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.747722>
- Hou, Y., Peng, J., Hong, L., Wu, Z., Zheng, E., & Li, Z. (2024). Gender control of mouse embryos by activation of TLR7/8 on X sperm via ligands dsRNA-40 and dsRNA-DR. *Molecules*, 29(1), 262.
- Iskandari, N. N., Madyawati, S. P., Wibawati, P. A., Suprayogi, T. W., Prastiya, R. A., & Agustono, B. (2020). Perbandingan pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa kambing Sapera pada penyimpanan suhu 5°C. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(2), 196–202.
- Lailiyah, F., Sianto, P., Saputro, A. L., Madyawati, S. P., Agustono, B., & Prastiya, R. A. (2018). Efektifitas daya pisah Electric Separating Sperm (ESS) terhadap spermatozoa kromosom X dan Y pada kambing Sapera. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 93–98.
- Masyitoh, H., Suprayogi, T. W., Praja, R. N., Sianto, P., Madyawati, S. P., & Saputro, A. L. (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. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol1.iss3.2018.105-112>.
- Mugiyati, M., Isnaini, N., Salim, M. A., & Susilawati, T. (2017). Pengaruh air kelapa merah yang muda dan tua sebagai pengencer terhadap kualitas semen kambing boer selama penyimpanan dingin. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, 18(1), 20–26. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2017.018.01.4>.
- Nagy, S., Kovacs, B., & Johannisson, A. (2023). Evaluation of domestic animal sperm head morphology via flow cytometric DNA labelling and pulse shape analysis using bull and stallion spermatozoa as model species. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(11), 1569–1575. <https://doi.org/10.1111/rda.14472>.
- Pramesthi, U., Mulyati, S., Sardjito, T., Gandul, M., & Yuliani, A. (2015). Identifikasi kualitas semen dan morfometri spermatozoa kambing Marica sebagai dasar pembuatan semen beku. *Ovozoa*.
- Ristiani, W. A., Yunus, M., Suprayogi, T. W., Sianto, P., & Mustofa, I. (2020). Kualitas Spermatozoa Post-Thawing Pejantan Sapi Friesian Holstein pada Umur yang Berbeda. *Ovozoa*, 9(1), 12–16.
- Saili, T. (1999). *Efektivitas Penggunaan Albumen Sebagai Medium Separasi Dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spennatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi* (Tesis). Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Saputro, A. L., Prastiya, R. A., Ulinuha, M. Z., & Widayani, P. (2022). The effectiveness of time equilibration before freezing in Sapera goat spermatozoa after electric separating sperm. *Jurnal Medik Veteriner*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol5.iss1.2022.1-8>.
- Setiawan, R., Widyastuti, R., Nurmeidiansyah, A. A., & Solihati, N. (2024). The effect of toll-like receptor 7/8 ligand in inhibiting the motility of putative X-chromosome-bearing sperm in rams. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 11(3), 648–654. <https://doi.org/10.5455/javar.2024.k814>.
- Sholikhah, E. F., & Dinasari, I. (2021). Analisis kualitas semen segar sapi Simmental pada umur yang berbeda. *Dinamika Rekasatwa: Jurnal Ilmiah (e-Journal)*, 4(02).
- Sirat, M. M. P., Setio, S., Birawa, F. R., Rabbani, R. N., Arif, M. D., Siswanto, S., & Dakhlan, A. (2025). Analisis kualitas semen segar kambing persilangan boer pada umur muda dan dewasa. *PETERPAN (Jurnal Peternakan Terapan)*, 7(1), 51–61.
- Solihati, N. (2017). Proportion and quality of XY chromosome bearing sperm on diluted semen after incubation in different time of etawah crossbreed goat. In *International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP)* (pp. 696–701).
- Solihati, N., Rasad, S. D., Yusrina, A., & Dimiyati, Y. I. (2017). Identifikasi morfometrik sperma domba lokal sebagai dasar aplikasi sexing

- sperma. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, 17(2), 109-113.
- Solihati, N., Rasad, S. D., & Setiawan, R. (2024). The effect of incubation time on the quality of post-thawed ram sexed sperm. *Livestock and Animal Research*, 22(2), 150-155.
- Sudarma, I. M. A., Nalley, W. N., Belli, H. L. L., & Marawali, A. (2014). Separasi spermatozoa X dan Y menggunakan level albumin. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 1(1), 37-43.
- Yusrina, A., Solihati, N., & Hilmia, N. (2018). Pengaruh waktu inkubasi pada proses sexing sperma berbasis glutathione terhadap motilitas dan membran plasma utuh chilled semen domba lokal. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran*, 18(1), 45. <https://doi.org/10.24198/jit.v18i1.17307>.
- Zaenuri, L. A., Rodiah, R., Dradjat, A. S., & Sumadisa, I. W. L. (2021). Komparasi bioetri semen dan morfometri spermatozoa kambing kacang, ettawa dan boer. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Indonesia (JITPI) Indonesian Journal of Animal Science and Technology*, 7(1), 19-28. <https://doi.org/10.29303/jitpi.v7i1.85>.