

Pengaruh Isobutil Metilxantina (IMX) dan Waktu Pemisahan terhadap Kualitas dan Efektifitas Pemisahan Spermatozoa dengan Metode Kolom Albumin Telur

R.G. SIANTURI, P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI dan D.A. KUSUMANINGRUM

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

(Diterima dewan redaksi 15 September 2004)

ABSTRACT

SIANTURI, R. G., P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI and D.A. KUSUMANINGRUM. 2004. The influence of isobutyl methylxanthine (IMX) and separation time on viability of spermatozoa and effectiveness of separation using egg albumin column. *JITV* 9(4): 246-251.

The separation of spermatozoa using egg-albumin is based on differences in motility, mass and morfometric of X and Y sperm. Supplementation of 3-isobutyl-1-1-methylxanthine (IMX), as a cAMP inhibitor phosphodiesterase and could raise sperm motility, is expected to optimize the X and Y sperm separation. The purpose of this research was to observe the effect of IMX supplementation and separation time on the quality of separated sperm and the effectiveness of the method of sperm separation. Completely randomized design with 2 x 2 factorial was used in this research. The first factor was IMX (0.0 and 0.5 mM) while the second factor was separation time (10 and 30 minutes). The parameters observed were sperm concentration, the percentages of sperm motility, live sperm, sperm with intact apical ridge and the ratio of spermatozoa X and Y which measured by morfometric of head sperm square. IMX supplementation did not affect sperm concentration both on 10 or 30 minutes. The 30-minute separation time significantly reduced sperm motility in upper fraction while the addition of IMX significantly reduced sperm motility in lower fraction. There were no significant differences on the percentage of live sperm and sperm with intact apical ridge in every treatment even in upper or lower fraction. The albumin column sperm separation in this research changed the ratio of X and Y spermatozoa from 49.7% : 50.3% (fresh semen) to 65.1-84.0% : 16.0-34.9% in upper fraction; and to 24.0-30.0% : 70.0-75.9% in lower fraction. The addition of IMX increased significantly X spermatozoa percentage (65.1 to 84.0%) and reduced significant Y-spermatozoa percentage (34.9% to 16.0%) in upper fraction. There was no significant differences on the ratio of X and Y spermatozoa between 10 and 30-minute of separation time treatment. In conclusion, the albumin column separation technique can be used to separate X and Y spermatozoa with the duration of 10 to 30 minutes separation time and did not severely affect the quality of separated sperm. The presence of IMX in separation media has no effect on the sperm separation effectiveness.

Key words: Sperm separation, isobutyl methylxanthine, X and Y spermatozoa, albumin column

ABSTRAK

SIANTURI, R. G., P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2004. Pengaruh isobutil metilxantina (IMX) dan waktu pemisahan terhadap kualitas dan efektifitas pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin telur. *JITV* 9(4): 246-251.

Pemisahan spermatozoa dengan albumin telur didasarkan atas perbedaan motilitas sperma X dan Y karena implikasi perbedaan motilitas, massa dan ukuran dari kedua jenis spermatozoa tersebut. Penambahan 3-isobutil-1-1-metilxantina (IMX) yang merupakan inhibitor cAMP phosphodiesterase dan dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, diharapkan dapat mengoptimalkan pemisahan spermatozoa X dan Y. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan IMX dan pengaruh waktu pemisahan terhadap kualitas sperma dan efektifitas pemisahan spermatozoa X dan Y. Rancangan penelitian adalah RAL pola faktorial 2x2 dengan faktor IMX (0,0 dan 0,5 mM) dan faktor waktu pemisahan (10 dan 30 menit). Parameter yang diamati adalah kualitas sperma setelah pemisahan meliputi konsentrasi sperma, persentase sperma motil, hidup dan tudung akrosom utuh (TAU) serta rasio persentase spermatozoa X dan Y. Penambahan IMX tidak mempengaruhi konsentrasi spermatozoa baik pada pemisahan dengan waktu 10 maupun 30 menit. Pemisahan dengan waktu 30 menit secara nyata menurunkan motilitas spermatozoa hanya pada fraksi atas sedangkan penambahan IMX menurunkan motilitas sperma pada fraksi bawah. Tidak terdapat pengaruh yang nyata pada persentase sperma hidup dan TAU dari semua perlakuan baik pada fraksi atas dan fraksi bawah. Pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin dapat mengubah rasio spermatozoa X : Y dari 49,7% : 50,3% (semu segar) menjadi 65,1-84,0% : 16,0-34,9% pada fraksi atas; dan 24,0-30,0% : 70,0-75,9% pada fraksi bawah. Penggunaan IMX secara nyata meningkatkan persentase spermatozoa X (65,1 menjadi 84,0%) dan juga secara nyata menurunkan persentase spermatozoa Y (34,9 menjadi 16,0%) pada fraksi atas. Sedangkan lama waktu pemisahan tidak berpengaruh terhadap perubahan rasio spermatozoa X dan Y. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode pemisahan sperma menggunakan kolom albumin telur dengan waktu pemisahan 10-30 menit cukup efektif memisahkan spermatozoa dan

menghasilkan sperma hasil pemisahan yang masih baik kualitasnya untuk digunakan maupun diproses lebih lanjut. Penambahan IMX tidak memberikan keuntungan yang berarti dalam efektifitas pemisahan spermatozoa.

Kata kunci: Pemisahan sperma, isobutil metilxantina, spermatozoa X dan Y, kolom albumin

PENDAHULUAN

Efisiensi teknologi IB dapat ditingkatkan dengan keberhasilan menentukan kelamin anak yang akan dilahirkan. Anak jantan mempunyai pertumbuhan cepat dan bobot dewasa yang lebih berat dibandingkan betina, sehingga keberhasilan menghasilkan anak jantan pada usaha peternakan sapi potong akan meningkatkan produksi ternak sapi. Sebaliknya pada usaha sapi perah, umumnya anak sapi yang diharapkan kelahirannya adalah anak betina.

Spermatozoa terdiri dari dua jenis, yaitu spermatozoa pembawa kromosom X (spermatozoa X) dan spermatozoa pembawa kromosom Y (spermatozoa Y). Keberhasilan spermatozoa X membuahi sel telur akan menghasilkan anak dengan kelamin betina (XX) dan sebaliknya spermatozoa Y akan menghasilkan anak jantan (XY). Kedua jenis spermatozoa ini dilaporkan mempunyai sifat yang berbeda antara lain berat, densitas, motilitas, *surface charge* dan ukuran (FOOTE, 1982). Teknologi pemisahan spermatozoa berdasarkan perbedaan sifat-sifat tersebut sudah banyak dilakukan (HAFEZ dan HAFEZ, 2000). Teknologi dengan *flow cytometry* akhir-akhir ini telah dilaporkan dapat memisahkan spermatozoa X dan Y lebih akurat akan tetapi dengan menggunakan peralatan yang kompleks dan sangat mahal (JOHNSON *et al.*, 1994; SEIDEL dan JOHNSON, 1999). Teknologi yang dapat dengan mudah diaplikasikan antara lain teknologi pemisahan dengan menggunakan serum albumin dan sephadex (BEERNINK, 1985). Namun, teknologi pemisahan ini masih belum optimum karena disamping menggunakan zat kimia yang cukup mahal, pemutaran sperma, sedikitnya volume yang digunakan dan juga diperlukan waktu yang lama, mengakibatkan motilitas sperma menjadi rendah.

Prinsip pemisahan spermatozoa dengan serum albumin (*bovine serum albumin* atau *human serum albumin*) adalah didasarkan pada kecepatan motilitas spermatozoa, dimana spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi atau spermatozoa pembawa kromosom Y akan lebih awal menembus media pemisah albumin yang lebih pekat (MAXWELL *et al.*, 1984). Putih telur dari telur ayam dapat digunakan sebagai albumin alternatif pengganti BSA (*bovine serum albumin*) dalam proses pemisahan spermatozoa dan dianggap cukup layak untuk digunakan. Selain mudah terjangkau dan murah, putih telur juga cukup efektif memisahkan spermatozoa X dan Y (SAILI, 1999).

Senyawa metilxantina, seperti kafeina, *theophylline* dan IMX (3-isobutil-1-metilxantina) merupakan zat kimia yang mempunyai fungsi sebagai inhibitor phosphodiesterase (PDE) dalam rantai cAMP. Inhibitor tersebut banyak digunakan dalam upaya meningkatkan motilitas dan *velocity*/kecepatan serta mempertahankan kualitas spermatozoa (JIANG *et al.*, 1984; TAKAHASHI dan FIRST, 1993; NOMURA *et al.*, 1997). Penggunaan metilxantina biasanya bertujuan meningkatkan kualitas sperma yang kurang baik maupun sperma beku yang akan *dithawing* dan digunakan untuk IB atau fertilisasi *in vitro* (SHARMA *et al.*, 1992). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan IMX dalam media pemisahan dan lama waktu pemisahan terhadap kualitas sperma dan perubahan rasio spermatozoa X dan Y setelah pemisahan.

MATERI DAN METODE

Penampungan semen

Pada penelitian ini digunakan seekor pejantan sebagai sumber semen yang dikoleksi seminggu sekali dengan menggunakan vagina buatan. Sapi pejantan tersebut ditempatkan pada kandang individu dan diberi pakan rumput dan minum secara *ad libitum* serta konsentrat sebanyak 8 kg hari⁻¹ ekor⁻¹ sebagai suplementasi. Segera setelah penampungan, semen dievaluasi kualitasnya dan hanya semen dengan kualitas baik saja yang digunakan dalam penelitian ini.

Pembuatan kolom

Pengencer yang digunakan adalah Tris Sitrat Bufer dengan 20%(v/v) kuning telur (KT) (SITUMORANG *et al.*, 2000). Media pemisahan yang dipakai untuk pembuatan kolom adalah pengencer yang mengandung putih telur dari telur ayam kampung yang masih segar dan sudah disaring. Kolom fraksi atas adalah pengencer yang mengandung 10% (v/v) putih telur, sedangkan untuk kolom fraksi bawah adalah pengencer yang mengandung 30% (v/v) putih telur. Lapisan kolom dibuat dengan cara memasukkan 2 ml fraksi bawah dan diikuti dengan 2 ml fraksi atas secara perlahan-lahan.

Penambahan IMX, dilakukan sejumlah 0,5 mM IMX pada setiap fraksi. Media fraksi atas adalah Tris Sitrat + 20% KT + 10% putih telur + 0,5 mM IMX, sedangkan fraksi bawah adalah Tris Sitrat + 20% KT + 30% putih telur + 0,5 mM IMX.

Pemisahan spermatozoa

Secepatnya setelah penampungan, semen dievaluasi dan diencerkan 1:1 dengan pengencer Tris 20% KT. Sebanyak 1 ml suspensi diletakkan di atas permukaan lapisan kolom albumin, kemudian dibiarkan selama 10 dan 30 menit sebagai perlakuan waktu pemisahan. Untuk pemanenan, 2 ml dari suspensi teratas dari permukaan diambil sebagai hasil pemisahan fraksi atas dan 2 ml lapisan terbawah sebagai hasil pemisahan fraksi bawah, sedangkan 1 ml suspensi yang ada di tengah atau diantaranya dibuang. Hasil pemisahan fraksi atas dan bawah diencerkan 1:3 dengan Tris Sitrat 20% KT dan disentrifus (1500 rpm) selama 10 menit untuk mencuci sperma dari larutan putih telur. Pelet hasil sentrifuse diencerkan kembali dengan Tris Sitrat 20% KT sehingga mempunyai konsentrasi akhir 100 juta spermatozoa/ml atau konsentrasi standar untuk dibekukan. Setelah itu, sperma yang sudah diencerkan dievaluasi kualitasnya serta diamati morfometri sperma dari tiap-tiap fraksi dan perlakuan dengan memakai mikroskop.

Rancangan penelitian

Rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 2. Konsentrasi IMX yang ditambahkan pada media pemisahan (0,0 dan 0,5 mM) sebagai faktor pertama dan waktu pemisahan sebagai faktor kedua (10 dan 30 menit). Parameter yang diamati adalah kualitas spermatozoa meliputi konsentrasi spermatozoa, persentase motilitas (%M), hidup (%H) dan tudung akrosom utuh (%TAU) serta persentase sperma X dan Y. Penentuan persentase spermatozoa pembawa kromosom X dan Y adalah berdasarkan pengamatan morfometri, yaitu mengukur ukuran luas kepala spermatozoa (panjang x lebar) menggunakan mikroskop yang dilengkapi alat micrometer dengan pembesaran 1000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil evaluasi semen segar baik secara makroskopik maupun mikroskopik memberikan gambaran karakteristik semen sapi yang normal (Tabel 1). Angka rata-rata yang diperoleh merupakan nilai rata-rata kualitas semen sapi sebanyak 8 kali ulangan. Dari hasil tersebut, baik dari pengamatan secara makroskopik maupun mikroskopik, semen segar yang digunakan mempunyai rata-rata kualitas yang baik dan memberikan gambaran karakteristik semen sapi yang normal dan sangat layak untuk diproses lebih lanjut. Perbandingan

spermatozoa X : Y yang diperoleh di laboratorium sebesar 49,7% : 50,3% mendekati perbandingan secara teoritis. Secara teoritis komposisi spermatozoa X : Y dalam semen segar adalah 50% : 50% (REED, 1985; MCDONALD dan PINEDA, 1982; HAFEZ dan HAFEZ, 2000).

Tabel 1. Kualitas semen segar hasil penampungan

Penilaian	Rataan \pm SD ^{*)}
Makroskopik:	
Volume (ml)	5,94 \pm 1,24
Warna	krem keputihan
Konsistensi	agak kental
pH	7
Mikroskopik:	
Konsentrasi (juta/ml)	1351 \pm 330
Gerakan massa	+++ ^{**)}
Sperma motil (%)	78,9 \pm 3,3
Sperma hidup (%)	86,4 \pm 2,8
Persentase tudung akrosom utuh (%)	77,6 \pm 4,6
Persentase spermatozoa pembawa kromosom X (%)	49,7 \pm 3,0
Persentase spermatozoa pembawa kromosom Y (%)	50,3 \pm 3,0

^{*)} hasil dari 8 kali ulangan ; ^{**)}+++ : sangat baik

Kualitas semen sapi meliputi konsentrasi, persentase sperma motil, sperma hidup dan tudung akrosom utuh (TAU) dari semen sapi setelah mengalami proses pemisahan dengan metode kolom albumin tersaji pada Tabel 2. Hasil pengamatan konsentrasi spermatozoa pada fraksi atas dan bawah terlihat bahwa konsentrasi terpadat dari semua perlakuan terdapat pada fraksi atas. Hasil ini menunjukkan bahwa distribusi spermatozoa dalam kolom semakin rendah pada kolom yang mengandung albumin tinggi (30%). Menurut ERRICSON dan GLASS (1982) hal tersebut disebabkan penambahan albumin ke dalam pengencer meningkatkan viskositas dan densitas pengencer sehingga membatasi jumlah sperma yang masuk, yaitu hanya sperma yang benar-benar motil yang dapat menembus pengencer dengan albumin 30%. Penambahan IMX tidak berpengaruh nyata terhadap konsentrasi spermatozoa baik pada waktu pemisahan 10 dan 30 menit pada kedua fraksi baik pada fraksi atas maupun fraksi bawah.

Tabel 2. Pengaruh penambahan IMX dan lama waktu pemisahan terhadap kualitas sperma hasil pemisahan pada fraksi atas dan bawah

Parameter	IMX	Fraksi atas			Fraksi bawah		
		10 menit	30 menit	Rata-rata	10 menit	30 menit	Rata-rata
Konsentrasi (juta/ml)	0,0 mM	640,5±331,2	653,9±294,2	647,2 ^a	522,2±312,9	530,0±256,4	526,1 ^a
	0,5 mM	770,0±198,6	615,0±357,2	692,5 ^a	439,4±337,7	476,1±243,8	457,7 ^a
	Rata-rata	705,2 ^p	634,4 ^p		480,8 ^p	503,0 ^p	
Motilitas (%)	0,0 mM	78,9±2,2	76,7±5,0	77,8±3,9 ^a	77,8±4,4	75,6±5,3	76,7±4,9 ^a
	0,5 mM	80,0±0,0	76,7±5,0	78,3±3,8 ^a	68,3±7,9	70,0±7,1	69,2±7,3 ^b
	Rata-rata	79,4±1,6 ^p	76,7±4,8 ^q		73,0±7,9 ^p	72,8±6,7 ^p	
Sperma hidup (%)	0,0 mM	85,2±3,9	86,9±2,1	86,0±3,3 ^a	84,6±3,1	85,4±5,2	84,9±4,2 ^a
	0,5 mM	86,7±2,1	85,0±2,7	85,8±2,5 ^a	81,4±6,3	81,0±5,2	81,2±5,6 ^b
	Rata-rata	85,9±3,2 ^p	85,9±2,5 ^p		83,0±5,0 ^p	83,1±5,5 ^p	
TAU (%)	0,0 mM	77,9±4,2	79,8±7,0	78,8±5,7 ^a	79,0±3,9	76,9±2,9	77,9±3,4 ^a
	0,5 mM	76,8±3,7	78,1±4,8	77,4±4,2 ^a	79,9±5,5	78,1±5,2	79,0±5,3 ^a
	Rata-rata	77,3±3,9 ^p	78,9±5,9 ^p		79,4±4,7 ^p	77,5±4,1 ^p	

^{ab} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata (P<0,05)

^{pq} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata (P<0,05)

Pada fraksi atas, rata-rata persentase sperma motil pada waktu pemisahan 10 menit (79,4%) nyata lebih besar (P<0,05) dibandingkan dengan persentase motil pada waktu pemisahan 30 menit (76,7%). Sedangkan pada fraksi bawah, walaupun terdapat tendensi yang sama dengan fraksi atas namun perbedaannya tidak nyata. Hal ini menggambarkan bahwa secara umum motilitas spermatozoa akan menurun seiring bertambahnya waktu pemisahan.

Dari Tabel 2, terlihat motilitas spermatozoa lebih rendah pada fraksi bawah dibandingkan dengan fraksi atas pada tiap perlakuan. Hal ini disebabkan karena diperlukan energi lebih banyak agar sperma dapat menembus albumin 30% sehingga motilitasnya jadi menurun. Pada fraksi atas, penambahan IMX tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata terhadap motilitas sperma, sedangkan pada fraksi bawah penambahan IMX menurunkan persentase sperma motil secara signifikan (P<0,05) yaitu dari 76,7% menjadi 69,2%. Penggunaan IMX ternyata tidak dapat mempertahankan motilitas sperma pada fraksi bawah dimana spermatozoa telah menurun tenaganya karena usaha menembus kolom albumin yang lebih pekat. Hal ini kemungkinan disebabkan penambahan IMX telah merangsang motilitas sejak awal perlakuan pemisahan yaitu saat mulai semen diletakkan di atas kolom

albumin sampai penembusan albumin 30%, sehingga menyebabkan terkurasnya energi dari sperma yang sampai ke fraksi bawah.

Persentase sperma hidup dan tudung akrosom utuh (TAU), secara umum tidak berbeda nyata (P>0,05) antar perlakuan baik pada fraksi atas maupun fraksi bawah. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan pemisahan dan sentrifugasi tidak membahayakan spermatozoa yaitu persentase sperma hidup dan keutuhan membran akrosom masih sangat baik dan normal seperti pada semen segar (Tabel 1). Secara umum kualitas semen setelah pemisahan masih layak untuk diinseminasi dan untuk diproses lebih lanjut yaitu dibekukan.

Pengaruh pemakaian IMX dan lama waktu pemisahan terhadap rasio spermatozoa pembawa kromosom X dan Y tertera pada Tabel 3. Dari tabel tersebut, dapat dikatakan bahwa teknik pemisahan kolom albumin dapat mengubah rasio X : Y pada semen segar yaitu dari 49,7% : 50,3% (Tabel 1) menjadi sekitar 73,5-84,0% : 16,0-26,6% pada fraksi atas; dan 24,0-30,0% : 70,0-75,9% pada fraksi bawah. Hasil ini menunjukkan bahwa teknik pemisahan dengan metode kolom albumin telur cukup efektif memisahkan spermatozoa X dan Y.

Tabel 3. Pengaruh penambahan IMX dan lama waktu pemisahan terhadap persentase spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada fraksi atas dan bawah

Jenis spermatozoa	Konsentrasi IMX	Fraksi atas			Fraksi bawah		
		Waktu pemisahan		Rata-rata	Waktu pemisahan		Rata-rata
		10 menit	30 menit		10 menit	30 menit	
X	0,0 mM	67,9	62,3	65,1 ^a	29,3	24,7	27,0 ^a
	0,5 mM	78,9	89,1	84,0 ^b	30,6	23,4	27,0 ^a
	Rata-rata	73,4 ^P	75,7 ^P		30,0 ^P	24,0 ^P	
Y	0,0 mM	32,1	37,7	34,9 ^a	70,7	75,3	73,0 ^a
	0,5 mM	21,1	10,9	16,0 ^b	69,4	76,6	73,0 ^a
	Rata-rata	26,6 ^P	24,7 ^P		70,0 ^P	75,9 ^P	

^{ab} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

^{Pq} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

Penggunaan IMX secara nyata meningkatkan persentase spermatozoa X (65,1% menjadi 84,0%) dan nyata menurunkan persentase spermatozoa Y (34,9% menjadi 16,0%) pada fraksi atas. Dengan perkataan lain bahwa penambahan 0,5 mM IMX ke dalam kolom albumin dapat memacu motilitas spermatozoa pembawa kromosom Y yang motilitasnya lebih tinggi dibandingkan spermatozoa X yang akan lebih cepat menembus lapisan bawah sehingga lebih cepat memisahkan diri meninggalkan lapisan atas. Sesuai yang dilaporkan oleh GARBERS *et al.* (1971) bahwa IMX menstimulasi motilitas dan proses respirasi. Namun pada fraksi bawah tidak terdapat perbedaan efektifitas pemisahan dengan atau tanpa IMX.

Penggunaan waktu pemisahan 10 menit maupun 30 menit juga tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata pada rasio spermatozoa X dan Y baik pada fraksi atas maupun fraksi bawah meskipun ada kecenderungan rasio perbedaan persentase kedua jenis spermatozoa meningkat seiring meningkatnya waktu pemisahan.

KESIMPULAN

Pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin berhasil mengubah rasio X : Y dari 49,30 : 50,70% menjadi 65,1-84,0% : 16,0-34,9% pada fraksi atas; dan 24,0-30,0% : 70,0-75,9% pada fraksi bawah. Untuk mendapatkan spermatozoa X digunakan fraksi atas sedangkan fraksi bawah digunakan apabila kita menghendaki spermatozoa Y.

Penambahan IMX 0,5 M tidak berpengaruh terhadap pemisahan spermatozoa X dan Y yang menggunakan metode kolom albumin. Pemisahan spermatozoa X dan Y metode kolom albumin dapat dilakukan selama 10 sampai dengan 30 menit

mengingat perbedaan waktu di antara keduanya tidak memberikan hasil yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- BEERNINK F.J. 1985. Technique for separating X and Y spermatozoa. *In: Foundations of In Vitro Fertilization*. C.M. FREDRICKS, J.D. PAULSON, A.H. DECHERNEY (Eds.). New York, Hemisphere Use of fresh and frozen-thawed bull sperm *in vitro*. *Theriogenology* 35: 204.
- ERICSON, R.J. dan R.H. GLASS. 1982. Functional differences between sperm bearing the X- or Y-chromosome. *In: Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. R.P. AMANN and G.E. SEIDEL, JR. (Eds.). Colorado University Associated Press. Boulder, Colorado, USA. pp. 201-211.
- FOOTE, R.H. 1982. Functional differences between sperm bearing X and Y chromosome. *In: Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. BP AMANN and G.E. SEIDEL, JR (Eds.). Colorado University Associated Press. Boulder, Colorado, USA.
- GARBERS, D.L., N.L. FIRST, J.J. SULLIVAN and A.H. LARDY. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.* 5: 336-339.
- HAFEZ E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa. *In: Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. E.S.E. HAFEZ and B. HAFEZ (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. pp. 390-394.
- JIANG, C.S., S.A. KILFEATHER, R.M. PEARSON and P. TURNER. 1984. The potencies of caffeine, theophylline, lysine-theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) on human sperm motility. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 18(2):258-262.

- JOHNSON, L.A., D.G. CRAN and C. POLGE. 1994. Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. *Theriogenology* 41: 51-56.
- MAXWELL, W.M.C., G. MENDOZA and I.G. WHITE. 1984. Post-thawing survival of rate motile ram semen after isolation by layering on protein columns. *Theriogenology* 21: 601-606.
- MCDONALD, L.E. and M.H. PINEDA. 1982. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fourth Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- NOMURA, M.K., K. INABA and M. MORISAWA. 1997. Role of cAMP-dependant Phosphorylation of dyne in Light Chain on the SAAF- dependant activation of sperm motility in the Ascidian *Ciona Interstitialis*. Morisawa Misaki Mar. Biol. Sta., Misaki Miura Kanagawa 238-02. *Japan*. p. 8.
- REED, K.C. 1985. Modification of the sex ration. *In: Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries*. RA. LEG, J.S.F. BARKE, D.B. ADAMS and K.J HUTCHINSON. (Eds.). 1985. University of New England. Australia.
- SAILI, T. 1999. Efektifitas penggunaan albumin sebagai medium separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada sapi. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- SEIDEL, JR. G.E. and L.A. JOHNSON. 1999. Sexing mammalian sperm-overview. *Theriogenology* 52: 1267-1272.
- SHARMA, M.L., G. MOHAN and K.L. SAHNI. 1992. A study on acrosomal damage on cryopreservation of crossbred bull semen. *Indian. Vet. J.* (69): 962-964.
- SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, A. LUBIS, T. SUGIARTI dan W. CAROLINE. 2000. Optimalisasi penggunaan chilling semen untuk meningkatkan persentase kebuntingan sapi perah. Laporan Penelitian Balitnak, Ciawi.
- TAKAHASHI, Y. and N.L. FIRST. 1993. *In vitro* fertilization of bovine oocytes in the precence of theophyline. *Anim. Reprod. Sci.* 34:1-18.