

Tingkat Keberhasilan Kebuntingan dan Ketepatan Jenis Kelamin Hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku *Sexing* pada Sapi Peranakan Ongole

(Success Rate of Pregnancy and Gender Accuracy as The Result of Artificial Insemination by Using Froozen Semen Sexing on Ongole Hybrid Cattle)

Trinil Susilawati

Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

Abstract

This research is meant to recognize the difference among pregnancy rate, service per-conseption (S/C) and pregnancy rate of the first Artificial Insemination or conseption rate (CR) and also calf sex accuracy which is born from Ongole hybrid cattle (PO) through Artificial Insemination with froozen semen deposition resulted from different consentration sexing at the position 4 (korpus uteri) and 4+ (bottom end of kornua uteri). The result of this research shows that Artificial Insemination at the position 4 and 4+ with spermatozoa X: pregant 60% (from 10 cattles); CR for each 50%; S/C : 2.00 and 1.83; IB with spermatozoa Y equivalent 80% while S/C 1.42 and 1.25.

Key Words : Frozen sexing sperm, Service per conception, Calving rate

Pendahuluan

Inseminasi Buatan menggunakan semen hasil *sexing* merupakan suatu teknologi reproduksi dengan tujuan untuk perbaikan mutu genetik ditunjang dengan pengaturan jenis kelamin anak yang dilahirkan.

Beberapa metode *sexing* atau pemisahan spermatozoa X dan Y yang telah dilakukan antara lain metode sedimentasi, albumin column, sentrifugasi gradien densitas *percoll*, elektroforesis, *H.Y. antigen*, *flow cytometri* dan filtrasi dengan *sephadex column* (Hafez, 2000). Dari berbagai metode pemisahan tersebut, sentrifugasi gradien densitas *percoll* menghasilkan spermatozoa pada bagian atas adalah Y dan bagian bawah X sebanyak 89% (Susilawati *et al*, 1996). Selanjutnya dinyatakan bahwa spermatozoa hasil *sexing* tersebut telah berhasil dibekukan, sehingga memungkinkan digunakan pada daerah yang lebih luas dalam jangka waktu yang lama.

Keberhasilan IB di Indonesia menggunakan semen beku tanpa *sexing* saat ini sudah tidak diragukan lagi, dengan standar semen beku yang digunakan mengacu kepada SNI 01 – 4869.2 – 1998 dengan konsentrasi spermatozoa 25 juta per *straw*. Konsentrasi semen beku hasil *sexing* menggunakan sentrifugasi gradien densitas *percoll* adalah spermatozoa X sebesar 6 juta dan Y sebesar 12 juta (Susilawati, 2003) .

Indikator keberhasilan IB dapat dilihat dari perolehan angka kebuntingan, *Service per Conception* (S/C) dan persentase kebuntingan pada IB I atau *Conception Rate* (CR). Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan tersebut adalah deposisi semen pada alat reproduksi sapi betina, sehingga untuk dapat diaplikasikan secara luas perlu dilakukan uji keberhasilan kebuntingan dan ketepatan jenis kelamin anak sapi (pedet) yang dilahirkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan angka kebuntingan, *Service per Conception* (S/C) dan persentase kebuntingan

pada IB ke I atau *Conception Rate* (CR) serta ketepatan jenis kelamin pedet yang dilahirkan pada sapi Peranakan Ongole (PO) melalui IB dengan deposisi semen beku hasil *sexing* yang berbeda konsentrasi di posisi 4 (korpus uteri) dan 4+ (pangkal kornua uteri).

Hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai pedoman Inseminator dalam melaksanakan IB di lapangan, untuk memperoleh angka kebuntingan, S/C dan CR yang optimal, serta ketepatan jenis kelamin pedet yang dilahirkan. Sebagai dasar memberikan rekomendasi pelaksanaan IB menggunakan semen beku hasil *sexing* dengan konsentrasi rendah.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dua tahap, tahap pertama adalah pembekuan spermatozoa hasil *sexing* di Balai Inseminasi Buatan Singosari, tahap kedua berupa percobaan dilakukan di peternakan sapi PO (Peranakan Ongole) milik rakyat di Kecamatan Pakis Kabupaten Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2003 sampai Januari 2004.

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan dengan sampel sebanyak 60 ekor sapi PO induk yang diambil secara *purposive sampling* dengan kriteria : pernah beranak paritas 1 – 3, siklus berahi normal, tidak pernah mengalami gangguan reproduksi atau *distokia*, anatomi alat reproduksinya normal, skor kondisi tubuh antara 6 – 7 (skala 1 – 9) dan manajemen pemeliharaan yang relatif sama. Pelaksanaan penelitian menggunakan 6 (enam) perlakuan, dengan masing-masing ulangan 10 ekor sapi.

Variabel yang diamati adalah NRR, S/C, CR dan angka kebuntingan. NRR adalah persentase sapi betina akseptor IB yang tidak kembali lagi berahi selama 20-60 hari atau 60-90 hari pasca pelaksanaan IB (Partodihardjo, 1982). S/C adalah banyaknya dosis *straw* yang dipergunakan untuk memperoleh sejumlah kebuntingan pada kelompok

akseptor IB, sedangkan CR merupakan jumlah akseptor yang bunting pada IB ke I dibagi jumlah semua akseptor kali 100%. Penjelasan S/C dan CR dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$S/C = \frac{\sum \text{service yang dipergunakan}}{\sum \text{akseptor bunting}}$$

$$C R = \frac{\sum \text{bunting IB ke I}}{\sum \text{akseptor}} \times 100 \%$$

Prosedur Penelitian

1. Pelaksanaan IB pada sapi yang terpilih dan benar-benar menunjukkan tanda-tanda berahi sempurna seperti : suara melenguh, *vulva* bengkak, keluar lendir transparan dan gelisah.
2. IB dilakukan sesuai dengan perlakuan (posisi 4 dan 4+).
3. IB dengan semen X dilakukan dengan dobel dosis (2 kali memasukkan *insemination gun* @ 6 juta/dosis), sedangkan semen Y dilakukan dosis tunggal (12 juta).
4. Pengamatan kebuntingan melalui NRR dilakukan pada hari ke 21, 42, 63 setelah IB.
5. Sapi yang kembali berahi setelah IB ulang 3 kali dianggap gagal.
6. Sapi yang dianggap bunting karena tidak berahi lagi sampai dengan NRR ke-3, untuk lebih memastikan akurasi dilakukan pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal.

Analisis Data

Data pengamatan yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji *Chi-Kuadrat* (χ^2), yaitu tingkat kebuntingan dari masing-masing perlakuan IB pada sapi PO dengan semen beku hasil *sexing* metode sentrifugasi gradien densitas *percoll* berkromosom X, Y dan tanpa *sexing* (XY). Pengamatan kebuntingan dievaluasi melalui

NRR (0 – 30)hari, (30 – 60)hari dan (60 – 90)hari dan palpasi rektal. Menurut Sudjana (1990), Uji χ^2 pada dasarnya adalah pengujian yang membandingkan antara frekuensi observasi, yaitu data pengamatan yang diperoleh saat melakukan penelitian dengan frekuensi harapan.

Hasil dan Pembahasan

Kualitas Spermatozoa Hasil *Sexing*

Persentase motilitas spermatozoa hasil *sexing* menggunakan metode sentrifugasi gradien densitas Percoll ditampilkan pada Tabel 1.

Semen segar yang digunakan untuk *sexing* memiliki pH 6,5 ; volume 7,2 cc, dan konsentrasi 1.419,2 juta. Setelah dilakukan *sexing* dan pembekuan, spermatozoa mengalami penurunan motilitas. Persentase motilitas spermatozoa X dan Y setelah pemisahan adalah 55%. Setelah dilakukan *thawing*, persentase motilitas X menurun menjadi 35% sedangkan spermatozoa Y menjadi 40%.

Penurunan kualitas spermatozoa selama pemisahan disebabkan spermatozoa mengalami serangkaian perlakuan mulai dari proses pemisahan hingga proses pencucian yang membutuhkan banyak energi untuk tetap mempertahankan kondisi fisiologisnya (Susilawati *et al.* 2001). Penurunan motilitas spermatozoa juga disebabkan saat inkubasi pada suhu 5°C. Hal ini sesuai pendapat Bearden and Fuquay (1984) bahwa penurunan temperatur akan menurunkan metabolisme spermatozoa yang akan berakibat menurun-

nya produksi energi sebagai energi mekanik atau kimiawi. Pengaruh mekanis saat sentrifugasi pada proses pencucian juga menyebabkan menurunnya motilitas spermatozoa. Akibat gaya sentrifugasi terhadap spermatozoa juga berpengaruh pada proses fisiologis terutama pada membran plasma. Proses pencucian yang berakibat pada pengurangan konsentrasi plasma semen dan medium pengencer mungkin merupakan salah satu faktor penyebab menurunnya nilai motilitas bila dihubungkan dengan ketersediaan sumber energi spermatozoa (Toelihere, 1985). Kemudian ditambahkan bahwa pemisahan spermatozoa X dan Y yang dilakukan dengan berbagai kecepatan dan lama waktu sentrifugasi menunjukkan bahwa semakin lama dan semakin tinggi kecepatan menyebabkan penurunan motilitas. Hal ini disebabkan karena pada saat dilakukan sentrifugasi, terjadi gesekan antar spermatozoa dan antara spermatozoa dengan medium pemisah. Akibatnya terjadi kerusakan struktur membran spermatozoa dan gangguan metabolisme. Selain itu spermatozoa merupakan sel hidup yang mempunyai sifat yang khas dan sangat rentan terhadap perlakuan mekanis maupun kimia. Pemisahan dengan sentrifugasi dapat mengakibatkan terpisahnya spermatozoa dengan seminal plasma juga akan mengakibatkan selubung luar spermatozoa atau akrosomnya rusak. Dalam kondisi yang demikian maka spermatozoa akan kehilangan bahan-bahan penyangga dan makanan sebagai sumber nutrisi (Susilawati *et al.* 1997). Hal inilah yang menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa.

Tabel 1. Data persentase motilitas spermatozoa

Variabel	Spermatozoa X (%)	Spermatozoa Y (%)	Kontrol (%)
Semen segar	75	75	75
Setelah <i>sexing</i>	55	55	-
Setelah <i>thawing</i>	35	40	40

Proses pembekuan juga menyebabkan terjadinya penurunan kualitas yang drastis. Hal ini karena adanya kerusakan membran akibat perlakuan tersebut, sehingga pada proses pendinginan dan pembekuan lebih mudah terkena *cold shock*. Goulding *et al* , (1994) menambahkan bahwa akibat terjadinya *cold shock* pada saat proses pembekuan dapat menyebabkan meningkatnya angka kematian spermatozoa, menurunkan persentase motilitas setelah *thawing* dan menurunkan fertilitas spermatozoa. Menurut Hafez (2000), persentase motilitas spermatozoa akan menurun 25-50% akibat proses pembekuan.

Konsentrasi spermatozoa setelah *sexing* mengalami penurunan yaitu pada spermatozoa X adalah 6 juta/*straw*, sedangkan spermatozoa Y adalah 12 juta/*straw*. Perbedaan ini digunakan sebagai dasar untuk penentuan dosis pada pelaksanaan IB. Rendahnya konsentrasi spermatozoa beku *sexing*, karena pada saat proses *sexing*, semen yang digunakan jumlahnya sedikit kemudian dimasukkan pada medium pemisah, selain itu yang diambil adalah pada medium yang mengandung proporsi semen X atau Y nya yang tinggi, sedangkan pada bagian yang proporsi spermatozoa X dan Y nya hampir sama dibuang.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa hasil *sexing* mempunyai konsentrasi di bawah standar SNI, yang meliputi konsentrasi spermatozoa 25 juta dengan motilitas 40% dan abnormalitas <20%.

Evaluasi Keberhasilan Kebuntingan

Pelaksanaan IB menggunakan semen beku hasil *sexing* yang mengandung spermatozoa X dengan 10 ekor sapi pada posisi 4 menghasilkan 6 ekor (60%) yang bunting, sedangkan di posisi 4⁺ juga menghasilkan 6 ekor (60%). Tampak perlakuan deposisi semen tidak berpengaruh terhadap angka kebuntingan, berarti deposisi sementidak

mempengaruhi perjalanan spermatozoa X didalam proses fertilisasi. Hal ini karena spermatozoa X mempunyai ketahanan hidup lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa Y karena materi genetik yang dikandung dalam kepala spermatozoa X lebih banyak daripada spermatozoa Y. Sesuai dengan pendapat Hafez (2000) spermatozoa lebih tahan hidup dibanding spermatozoa Y.

Deposisi semen beku hasil *sexing* yang mengandung spermatozoa Y di posisi 4 menghasilkan 7 ekor (70%) yang bunting, sedangkan di posisi 4⁺ menghasilkan 8 ekor (80%). Angka kebuntingan ini lebih tinggi dibandingkan dengan IB spermatozoa X. Hal ini karena pada spermatozoa X konsentrasi yang di inseminasikan lebih rendah yaitu 6 juta dengan doble dosis, sehingga fakta ini menunjukkan bahwa konsentrasi 12 juta/*straw* tidak sama dengan 6 juta/*straw* dengan doble dosis, selain itu juga karena spermatozoa Y gerakanya lebih cepat menuju tempat fertilisasi.

Sebagai perbandingan IB menggunakan spermatozoa tanpa *sexing* (XY) baik di posisi 4 atau 4⁺, menghasilkan kebuntingan yang sama dengan IB menggunakan spermatozoa Y. Hal ini dimungkinkan karena konsentrasi spermatozoa tanpa *sexing* (XY) jumlahnya mencapai 25 juta/*straw*, sehingga kompetisi spermatozoa dalam hal mengadakan pembuahan peluangnya lebih besar. Sedangkan spermatozoa Y dengan konsentrasi 12 juta/*straw* mempunyai kelebihan yaitu lebih ringan dan gerakannya lebih cepat menuju ovum. Selain itu waktu pelaksanaan IB, untuk sapi-sapi yang menggunakan spermatozoa Y mungkin lebih tepat dibandingkan dengan yang lain.

Analisis data dengan uji *chi-kuadrat* (χ^2) sebagaimana menunjukkan bahwa angka kebuntingan dengan semen beku hasil *sexing* di posisi 4 dan 4⁺ tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan semen beku tanpa *sexing*.

Tabel 2. Hasil angka kebuntingan, perhitungan CR dan S/C pada berbagai perlakuan

Pelaksanaan IB	Bunting	Tidak Bunting	CR (%)	S/C
Spermatozoa X (4)	6	4	50	2.00
Spermatozoa X (4+)	6	4	50	1.83
Spermatozoa Y (4)	7	3	70	1.42
Spermatozoa Y (4+)	8	2	80	1.25
Spermatozoa XY (4)	7	3	70	1.42
Spermatozoa XY (4+)	8	2	80	1.25

Hal ini menunjukkan bahwa angka kebuntingan melalui IB menggunakan semen beku hasil *sexing* dengan konsentrasi rendah di posisi 4 dan 4⁺ dapat mendekati bahkan sama khususnya spermatozoa Y dibanding dengan hasil IB semen beku tanpa *sexing*. Data kebuntingan lebih jelas dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil perhitungan CR untuk spermatozoa X sebesar 50% dengan S/C sebesar 2,00 di posisi 4, dan CR 50% dengan S/C 1,83 di posisi 4⁺ lebih rendah dibandingkan dengan CR dan S/C untuk spermatozoa Y. Pada posisi 4 CR 70% dengan S/C 1,42 dan di posisi 4⁺ CR 80% dengan S/C 1,25. Sama halnya dengan spermatozoa XY, CR pada posisi 4 sebesar 70% dengan S/C 1,42 dan pada posisi 4⁺ CR 80% dengan S/C 1,25.

Hasil pengamatan tersebut, CR dan S/C pada hasil IB dengan spermatozoa Y dapat dikatakan baik dan masih dalam kisaran normal, sesuai dengan pendapat Hardjopranjoto (1995) yang menyatakan bahwa efisiensi reproduksi dikatakan baik jika CR dapat mencapai 65 - 75%. Toelihere (1985), menambahkan bahwa S/C normal adalah 1,6 - 2,1 dan semakin rendah nilainya maka semakin tinggi pula nilai kesuburannya. Hasil tersebut menurut Susilawati (2003b) lebih baik daripada menggunakan semen *sexing* dengan metode gradien putih telur.

Rendahnya CR dan S/C semen beku yang mengandung spermatozoa X kemungkinan disebabkan oleh angka motilitas daripada spermatozoanya, atau menurunnya kualitas

straw akibat dari *handling* yang kurang baik, sehingga untuk sampai di tingkat peternak yang terlalu jauh pada saat pelaksanaan IB sudah menurun. Juga menurut Susilawati (2001b) spermatozoa setelah mengalami proses sentrifugasi banyak yang mengalami kerusakan membran, sehingga akan menurunkan kualitasnya.

Penurunan kualitas *straw* tersebut terlihat pada saat dilakukan *thawing*, ada sebagian *straw* yang melayang di air yang menunjukkan bahwa volume udara di dalam *straw* tersebut lebih banyak dibanding dengan yang normal. Faktor lain yang mempengaruhi rendahnya CR dan S/C adalah umur sapi. Hal ini sesuai dengan pendapat Hafez (2000) yang menyatakan bahwa semakin tua umur seekor sapi maka akan semakin menurun angka kebuntingannya. Hunter (1995), menambahkan bahwa sapi yang berumur 6 - 7 tahun dan lebih besar dari 7 tahun, memiliki fertilitas yang lebih rendah dibandingkan sapi yang lebih muda, dan memiliki persentase kegagalan kebuntingan sebesar 10%.

Hasil IB menggunakan semen beku *sexing* yang mengandung spermatozoa X lebih rendah bila dibandingkan dengan IB menggunakan spermatozoa tanpa *sexing* (XY). Akan tetapi IB menggunakan semen beku *sexing* yang mengandung spermatozoa Y menghasilkan kebuntingan yang sama dengan IB menggunakan semen beku tanpa *sexing*. Secara umum, IB dengan spermatozoa X maupun Y, bila dibandingkan dengan XY dapat dikatakan lebih baik, karena semen

beku hasil *sexing* tersebut konsentrasinya lebih rendah. Konsentrasi spermatozoa X hanya 6 juta dengan total spermatozoa motil 2,1 juta dengan pelaksanaan IB 2 dosis, dan konsentrasi spermatozoa Y hanya 12 juta dengan total spermatozoa motil 4,8 juta. Keadaan yang demikian mampu menghasilkan kebuntingan yang hampir sama dengan kebuntingan yang dihasilkan melalui IB menggunakan semen beku tanpa *sexing* yang berkualitas standart SNI yakni konsentrasi 25 juta dengan motilitas 40% sehingga mempunyai jumlah spermatozoa motil sebesar 10 Juta per dosis. Hal ini kemungkinan disebabkan karena daya fertilitas dan kemampuan bertahan hidup spermatozoa di dalam saluran alat kelamin betina yang lebih baik, tingkat kemahiran keterampilan Inseminator, ketepatan diagnosis keberadaan folikel de Graaf pada ovarium, dan ketepatan deposisi spermatozoa. Sehingga walaupun dengan jumlah spermatozoa yang motil hanya 2,1 juta dengan pelaksanaan IB 2 dosis dan 4,8 juta mampu menghasilkan kebuntingan. Hafez (1993) menyatakan bahwa walaupun jutaan spermatozoa dideposisikan pada saluran kelamin betina, hanya sedikit spermatozoa yang mampu bertahan hidup dan membuahi ovum di tempat fertilisasi. Keterampilan Inseminator dan rata-rata $9,67 \pm 2,005$ jam pelaksanaan IB setelah ternak menunjukkan berahi menggunakan spermatozoa X dan Y berpengaruh terhadap keberhasilan kebuntingan. Hafez (2000) menyatakan bahwa keberhasilan kebuntingan dengan IB dipengaruhi oleh kualitas semen, keterampilan peternak, keterampilan Inseminator dan ketepatan waktu mengawinkan sapi.

Kembali berahinya sapi setelah di IB disebabkan oleh beberapa faktor antara lain, karena kurangnya perhatian peternak terhadap deteksi berahi dan keterlambatan saat melapor sehingga dapat menyebabkan keterlambatan saat melaksanakan IB. Pakan yang diberikan pada musim kemarau kualitasnya jelek, sehingga dapat menyebabkan kembalinya sapi

berahi lagi dan berakibat rendahnya CR dan S/C.

Jenis kelamin yang dihasilkan

Jenis kelamin pedet yang dilahirkan sesuai dengan perlakuan terdapat pada Tabel 3. Berdasarkan pada hasil jenis spermatozoa setelah dilakukan *sexing* dengan metode sentrifugasi gradient densitas percoll didapatkan 89% spermatozoa X pada lapisan bawah, sedangkan pada lapisan atas didapat spermatozoa Y 89%. Hal ini bila dibandingkan dengan data jenis kelamin anak yang dihasilkan masih sesuai dengan harapan atau perkiraan. Yaitu pada spermatozoa X pada posisi 4 didapatkan 100% betina, sedang posisi 4+ 83% betina.

Tabel 3. Jenis kelamin anak yang dilahirkan pada berbagai perlakuan

Pelaksanaan IB	Betina	Jantan
Spermatozoa X (4)	6 (100%)	0%
Spermatozoa X (4+)	5 (83%)	1 (17%)
Spermatozoa Y (4)	2 (29 %)	5 (71%)
Spermatozoa Y (4+)	2 (25%)	6 (75%)
Spermatozoa XY (4)	4 (57%)	3 (43%)
Spermatozoa XY (4+)	4 (50%)	4 (50%)

Pada spermatozoa Y pada posisi 4 didapatkan anak jantan 71%, sedangkan pada posisi 4+ didapatkan 75%, data menunjukkan ketepatan jenis kelamin jantan masih lebih rendah dibandingkan proporsi spermatozoa Y yaitu 87%.

Hasil Tabel 3 menunjukkan bahwa pada posisi 4+ mempunyai kecenderungan menghasilkan anak jantan, hal ini karena spermatozoa Y mempunyai motilitas lebih cepat dibandingkan spermatozoa X, sehingga apabila posisi IB lebih dekat dengan oosit (posisi 4+), maka akan memungkinkan terjadinya anak jantan, pernyataan ini ditunjang oleh pendapat Hafez (2000) bahwa spermatozoa Y mempunyai motilitas lebih cepat dibanding spermatozoa X.

Kesimpulan

IB menggunakan spermatozoa Y yang mempunyai konsentrasi 12 juta, menghasilkan kebuntingan yang sama dengan tanpa sexing dengan konsentrasi 25 juta, sedangkan spermatozoa X dengan konsentrasi 6 juta dengan dobel dosis hasilnya lebih rendah, begitu juga dengan *Service per Conception*. Hasil IB dengan spermatozoa X menghasilkan anak betina sesuai dengan proporsi spermatozoa X yaitu di atas 80% (dari masing-masing 10 ekor), sedangkan menggunakan spermatozoa Y dihasilkan anak jantan lebih rendah dari proporsi spermatozoa Y, yaitu hanya sekitar 75%. Deposisi semen pada posisi 4+ meningkatkan keberhasilan kebuntingan dan jumlah anak yang jantan.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada jumlah yang lebih banyak, sehingga akurasi semakin tinggi, juga dilakukan upaya peningkatan konsentrasi spermatozoa untuk meningkatkan keberhasilan kebuntingan. Perlu dilakukan uji produksi dan penghitungan secara ekonomis, hal ini sebagai pedoman didalam penjualan semen beku.

Daftar Pustaka

- Bearden HJ and Fuquay JW, 1984. *Applied Animal Reproduction*. 2nd Edition. Reston Publishing Company Inc. Prentice-Hall Company. Reston Virginia.
- Goulding, DH, Williams JF, Roche and Boland MP, 1994. Effect of Exogenous Progesterone on Superovulatory Response in Heifers Insemination with Fresh or Frozen Semen. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 100.
- Hafez ESE, 2000. *Reproduction In Farm animal*. 7th Edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hardjopranjoto S, 1995. *Ilmu Kewanjiran pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hunter RHT, 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Alih Bahasa Petro PKH Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Partodihardjo S, 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara. Jakarta.
- Susilawati T, Sumitro BS, Sri Rahayu, Ciptadi G, Isnaini N, 1996. Separation of X-Y Chromosome Bearing Sperm in Indonesia Native Bull with Sephadex G-200 Presented 13th Congress Animal Reproduction. Sydney 29 Juni – 5 Juli.
- Susilawati T, 1997. Pemisahan spermatozoa X dan Y manusia dengan metoda filtrasi sephadex G-100 dan sentrifugasi gradien densitas percoll. Dipresentasikan (Oral presentasi) pada Forum Komunikasi Reproduksi. Pengembangan reproduksi di Indonesia dalam visi 2020. Denpasar, 6-8 November 1997.
- Susilawati T, Sumitro SB, Hardjopranjoto S, Hinting A, 2001. Change of function and structure of Bull sperm membrane after percoll gradient centrifugation on sexing process. *Reprotech. The Indonesian Journal Reproductive Science and Technology*. Vol 1. No.1. July 2001.
- Susilawati T, 2001b. Pengaruh Disposisi Semen pada Posisi 4 dan 4 + saat IB Terhadap Keberhasilan Kebuntingan pada Sapi PO setelah Penyuntikan PGF 2α. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati 2003. *Inseminasi Buatan dengan spermatozoa Beku Hasil Sexing dengan spermatozoa Beku Hasil Sexing pada sapi*. Makalah dipresentasikan pada Kongres I Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI) Denpasar Bali.
- Susilawati T, 2003b. "Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur". *Jurnal "PROTEIN"* No. 20 ISSN : 1410-3281, Juli-Desember 2003.
- Toelihere MR, 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.