

Efektifitas Kinerja Pentoksifilin Terhadap Kualitas dan Integritas Membran Plasma Utuh pada Sperma Sapi Bali Hasil Pemisahan dengan Menggunakan Albumin

(The Effectivity of Pentoxyfilon the Quality and Plasma Membrane Integrity of Bali Bull Spermatozoa Separated Using Albumin)

Rodiah, Enny Yuliani, Adji Santoso Dradjat, Chairussyuhur Arman

Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Mataram, Jl. Majapahit 62 Mataram Lombok 83125, Indonesia. Telephon. (0370) 633603. Faks. (0370) 640592.
E-mail: rodiah.makbul@yahoo.com

Diterima : 22 Februari 2015/ Disetujui: 27 April 2015

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the effect of Pentoxyfilline in maintaining the quality (motility, viability, morphology and plasma membrane intact) of Bali bull spermatozoa separated with albumine. A Completely Random Block Design was used in this study with two main factors (upper layer and bottom layer), diluents with four doses of pentoxyfilline (0, 15, 20 and 25 μM) with six replications. Evaluation of spermatozoa was performed by characterizing motility, viability, morphology, plasma membrane intact. Result of the study showed that the effect of four doses pentoxyfilline on the quality of Bali bull spermatozoa was non significant ($p>0,05$). However, the addition of 25 μM pentoxyfilline was found to give the best effect compared to 15 μM , 20 μM and control. Result of the study also indicated that spermatozoa separated in the upper layer was significantly higher ($p<0,01$) than that of separated in the bottom layer with the average motility, viability, morfology and plasma membrane intact was 66,67,80,50, 6,71 and 65,61% respectively.

Keywords : pentoxifillynae , quality of sperm , separating with Albumin , Bali Bull

PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan plasma nutfah potensial yang mempunyai kualitas tinggi perlu dilestarikan kemurniannya dan dikembangkan untuk meningkatkan produktivitasnya melalui penerapan bioteknologi reproduksi. Bioteknologi reproduksi yang pesat dikembangkan untuk menciptakan ternak unggul pada masa mendatang, yaitu dengan penerapan Inseminasi Buatan dan Transfer embrio. Kedua teknologi ini akan lebih berdaya guna, apabila anak yang dihasilkan berjenis kelamin sesuai dengan tujuan peternakan.

Pemisahan spermatozoa adalah upaya untuk mengubah perolehan spermatozoa yang berkromosom jenis X atau Y dengan metode tertentu, sehingga berubah dari proporsi normal (rasio alamiah), 50 persen banding 50 persen. Beberapa hasil penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa rata-rata kandungan spermatozoa X dan Y dalam semen sapi

adalah 49,5 persen dan 50,5 persen (Garner *et al.*, 1983). Pemisahan sperma X diarahkan pada peternakan sapi perah untuk memperoleh lebih banyak anak sapi betina, sedangkan pemisahan sperma Y diarahkan pada peternakan sapi potong untuk memperoleh anak sapi jantan. Salah satu metode pemisahan spermatozoa berdasarkan perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y adalah metode kolom albumin (Hafez, 1987).

Prosedur pemisahan dapat menginduksi kerusakan membran plasma, akrosom dan aglutinasi kepala spermatozoa sehingga dapat mengakibatkan penurunan motilitas dan daya fertilitas spermatozoa (Windsor *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 1996). Terdapat korelasi yang nyata antara motilitas spermatozoa dengan derajat integritas membran yang disebabkan oleh kerusakan ultra struktur, biokimia dan fungsi membran (Malmgre dan Martinez, 1996; Soderquist *et al.*, 1997). Integritas fungsi

sional membran spermatozoa yang baik harus ditunjang oleh integritas struktural membran spermatozoa yang baik pula. Membran pada bagian kepala spermatozoa berfungsi pada saat kapasitas, reaksi akrosom dan penetrasi zona pelusida pada saat fertilisasi, sedangkan membran bagian ekor berfungsi untuk mendapatkan substrat energi yang digunakan untuk pergerakan (Pedersen dan Fawcett, 1976). Motilitas spermatozoa memegang peranan penting dalam fertilisasi yang normal (Sikka dan Hellstrom, 1990) dan merupakan kebutuhan esensial dalam reproduksi (Tournaye, 1994). Hal ini penting bagi spermatozoa untuk melakukan penetrasi lendir servix, bermigrasi melalui uterus ke tuba falopii dan untuk penetrasi oosit agar bisa terjadi fertilisasi, baik *in vivo* maupun *in vitro*.

Pentoksifilin merupakan derivat metaloksin dapat meningkatkan motilitas dan memperpanjang masa aktif spermatozoa manusia (Arsyad, 1981), kapasitas dan reaksi akrosom (Kay *et al.*, 1994), angka fertilisasi oosit dengan mengurangi resiko kegagalan sepanjang siklus (Yovich, 1993; Tournaye, 1994). Selain itu, pentoksifilin juga telah dibuktikan memacu perkembangan embrio dua sel dan blastosis serta kemampuan fertilisasi spermatozoa manusia IVF (Tournaye, 1994). Namun efek utamanya adalah mempertahankan persentase motilitas spermatozoa (Yovich, 1993). Berkaitan dengan uraian dan fakta tersebut, menjadi dasar ilmiah untuk dilakukan penelitian tentang analisis kinerja Pentoksifilin terhadap kualitas dan integritas membran sperma sapi Bali hasil pemisahan dengan menggunakan albumin.

MATERI DAN METODE

Penampungan dan pemisahan spermatozoa

Semen sapi Bali ditampung dengan vagina buatan. Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap semen tersebut secara makroskopis (volume, warna dan bau, pH, konsistensi semen dan secara mikroskopis (gerakan massa, persentase motilitas, persentase daya hidup, persentase abnormalitas, persentase membran plasma utuh (MPU). Kriteria penilaian kualitas yang digunakan dalam

penelitian ini adalah motilitas spermatozoa dari semen segar setelah penampungan >70 %.

Pemisahan semen dilakukan dengan metode albumin bertingkat dengan media *Bovine Serum Albumin*, BSA (BSA 10 % untuk fraksi atas dan BSA 30 % untuk fraksi bawah). Semen dengan konsentrasi 300 juta sel per ml didiamkan selama satu jam di atas kolom albumin bertingkat, setiap fraksi semen dikoleksi dan ditampung dalam tabung sentrifus, kemudian dicuci dengan menggunakan medium EBSS (*Earle Balance Salt Solution*) lalu sentrifugasi pada kecepatan 1800 rpm selama 10 menit pada suhu 26–27°C. Fraksi atas diprediksi sebagai sperma X dan fraksi bawah sebagai sperma Y. Penambahan Pentoksifilin dilakukan sesudah dilakukan pemisahan spermatozoa dengan dosis 15 µM/ml, 20 µM/ml dan 25 µM/ml. Semen segar (tanpa penambahan pentoksifilin sebagai kontrol).

Semen hasil pemisahan (X atau Y) masing-masing diencerkan dengan pengencer tris yang mengandung 20% kuning telur (v/v). Parameter yang diamati: persentase motilitas, persentase daya hidup, persentase abnormalitas, persentase membran plasma utuh (MPU).

Motilitas

Sampel semen diambil 10-15 µl dengan mikropipet, diteteskan pada obyek gelas, ditutup dengan cover gelas (20 x 20 mm). Selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Penilaian dilakukan dengan mengamati gerakan progresif yang dibandingkan dengan yang bergerak mundur, atau hanya berputar saja mengikuti metode Garner dan Hafez (2008).

Viabilitas

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dan mati dilakukan pada preparat apus. Sebanyak 10 µl semen diletakkan pada salah satu ujung objek gelas, kemudian ditambahkan dengan 100 µl eosin negrosin, perlahan-lahan diaduk rata lalu dengan bantuan glas slide dibentuk apus/smear di atas glas slide pertama lalu dikeringkan. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Jumlah Spermatozoa hidup ditentukan dengan menghitung minimum 200 spermatozoa.

Morfologi spermatozoa

Preparat apus yang sama juga digunakan untuk pengamatan morfologi normal dan abnormal seperti kelainan kepala, kelainan leher dan bagian tangan serta kelainan ekor spermatozoa.

Integritas membran plasma utuh (MPU)

Integritas membran spermatozoa diamati dengan Metode *Hypoosmotis*

Swelling Test (HOS Test) yaitu evaluasi respon spermatozoa (swelling dan non swelling) pada kondisi hipoosmotis. Spermatozoa yang mempunyai membran rusak atau membran yang tidak aktif tidak dapat menyesuaikan tekanan osmosenya sehingga tidak menggelembung, sedangkan membran yang masih berfungsi terjadi pembengkakan, pengembangan atau pembengkokan ekor spermatozoa.

Analisis Data

Tabel 1. Rerata prosentase motilitas, viabilitas, morfologi dan HOST spermatozoa sapi Bali hasil pemisahan dengan penambahan berbagai level pentoksifilin

Perlakuan	Level pentoksifilin (%)				Rerata
	Kontrol	15 µM	20 µM	25 µM	
Motilitas atas	67.50	67.50	63.33	68.33	66.67 ^a
Motilitas bawah	55.83	60.83	50.83	62.50	57.50 ^b
Rerata	61.67 ^{ab}	64.17 ^a	57.08 ^b	65.42 ^a	
Viabilitas atas	83.67	79.17	75.17	84.00	80.50 ^a
Viabilitas bawah	69.67	69.67	60.00	71.50	67.71 ^b
Rerata	76.67 ^a	74.42 ^a	67.58 ^a	77.75 ^a	
Morfologi atas	5.83	6.17	9.83	5.00	6.71 ^a
Morfologi bawah	18.17	18.83	13.83	13.50	16.08 ^b
Rerata	88.83 ^a	88.33 ^a	88.17 ^a	90.75 ^a	
HOST atas	59.42	68.83	64.58	69.61	65.61 ^a
HOST bawah	70.93	74.81	68.63	75.16	72.38 ^b
Rerata	65.17 ^a	71.82 ^a	66.60 ^a	72.38 ^a	

^{ab}Superskrip yang berbeda pada kolom dg parameter yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (p < 0.01)

Terlihat bahwa hasil pengamatan terhadap prosentase progresif motilitas spermatozoa, viabilitas, morfologi mau-pun hasil HOST

Penelitian ini menggunakan Ran-cangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial yaitu 2 faktor utama (lapis atas dan lapis bawah), dengan masing-masing 3 perlakuan yaitu pemberian pentoksifilin 3 dosis (15 µM, 20 µM, dan 25 µM) dengan 6 kali ulangan. Data hasil penelitian berupa prosentase ditransformasi arcsin dianalisis menggunakan ANOVA (Steel dan Torrie, 1989) memakai program komputer SAS. Rata-rata ± s.e.m. untuk persentase progresif motilitas dan viabilitas, morfologi dan integritas membran (HOST), dibandingkan dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penilaian rata-rata terhadap berbagai parameter motilitas, viabilitas, morfologi dan Integritas membrane (HOST) spermatozoa semen sapi Bali dengan penambahan Pentoksifilin hasil pemisahan menggunakan albumin, disajikan pada Tabel 1.

hasil pemisahan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata lebih tinggi antara lapisan atas dibanding lapisan bawah (p<0,01) untuk

semua parameter di atas. Pada bagian atas/*swim up* yaitu memisahkan spermatozoa motil dari ejakulat dapat memperbaiki kualitas semen sapi Bali (Yuliani, 2000). Teknik tersebut dapat dipakai untuk seleksi beberapa fungsi normal dan untuk memperbaiki kemampuan fungsional sperma yang menurun. Spermatozoa yang berada pada lapisan atas setelah inkubasi mempunyai populasi sperma motil yang dapat diisolasi (Yuliani dan Lukman, 2012). Pada fraksi ini kaya akan spermatozoa Y yang mempunyai kemampuan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan spermatozoa X pada lapisan bawah hasil sentrifugasi yang cenderung lebih cepat membentuk endapan. Spermatozoa Y (lapisan atas) lebih ringan dan lebih ramping dari pada spermatozoa berkromosom X (lapisan bawah), sehingga sangat memungkinkan daya migrasinya akan lebih cepat ke atas permukaan atau migrasi ke samping (Jonson, 1999). Preparasi spermatozoa dengan metode *swim up* digunakan untuk memperoleh sperma dengan motilitas baik dan memungkinkan spermatozoa yang lebih motil dapat bermigrasi ke luar plasma sperma masuk dalam medium pencuci. Hasil yang diperoleh adalah meningkatnya angka motilitas, prosentase sperma hidup, konsentrasi spermatozoa dan meminimalkan kerusakan mekanik. Komponen-komponen pada lapisan bawah kemungkinan masih tercampur dengan cairan seminal dan tidak semuanya dapat melindungi dan mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa, melainkan juga mempunyai pengaruh negatif terhadap spermatozoa sehingga diperoleh hasil yang lebih rendah dibanding dengan lapisan atas. Teknik preparasi spermatozoa pada lapisan atas mempunyai keuntungan dapat terhindar dari terjadinya kontaminasi oleh bakteri atau toksin yang terdapat dalam plasma.

Progresif motilitas spermatozoa sapi bali yang diberi penambahan pentoksifilin dengan level yang berbeda didapatkan hasil berbeda nyata ($p < 0,05$) yaitu antara level 25 μM , 15 μM , dengan 20 μM . Sedangkan antara 25 μM , 15 μM dan kontrol (tanpa pentoksifilin) tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Pada hasil pemisahan fraksi atas didapat rata-rata

progresif motilitas spermatozoa 66,67%, sedangkan pada fraksi bawah rata-rata 57,50%. Perlakuan penambahan pentok-sifilin dengan level 15-25 μM pada fraksi atas menunjukkan nilai kisaran diatas 63% dengan nilai tertinggi di dapati pada level Pentok-sifilin 25 μM (68,33%). Sedangkan pada lapis bawah didapat progresif motilitas tertinggi diatas 50,83% dengan nilai tertinggi pada level 25 μM (62,50%). Menurut Sumadiase (1999), bahwa penambahan pentoksifilin dapat meningkatkan motilitas secara sangat nyata, yaitu 10-28 % pada perlakuan setelah simpan dingin dan masa aktif spermatozoa meningkat 12-45 menit pada perlakuan sebelum simpan dingin. Methylxanthines yang terdapat dalam pentok-sifilin dapat menghambat phosphodiesterase enzim, sehingga cenderung meningkat-kan konsentrasi AMP siklik (Arsyad, 1981). Selain itu methylxanthin dapat mengurangi produksi anion superoksida yaitu salah satu generasi dari reactive oxygen species (ROS). Dalam konsentrasi normal sekitar 85-90 % oksigen diperlukan oleh mitokondria untuk menghasilkan energy dalam bentuk ATP melalui fosforilasi oksidatif dan sekitar 3-5 % dari oksidan tersebut direduksi secara univalent menjadi ROS (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Mustofa (2002) mengata-kan, bahwa dengan penambahan pentoksifilin dapat meningkatkan prosentase sperma-tozoa motil pada normozoospermia dari 48,83% menjadi 55,5% dan dari 29,5% menjadi 39,33 % pada astenozoospermia. Mekanisme stimulasi pentoksifilin terhadap motilitas dan masa aktif spermatozoa adalah dengan cara menghambat aktivitas fosfodiesterase untuk memecah siklis adenosin monofosfat (c-AMP) menjadi 5'-AMP. Influx ion Ca^{++} ekstraseluler menstimulir adenilat siklase terikat membran untuk memproduksi c-AMP sehingga terjadi peningkatan konsentrasi c-AMP intraseluler (Wang *et al.*, 1993; Pang *et al.*, 1993; Mbizvo, 1993). Selanjutnya c-AMP bersama-sama dengan ion Ca^{++} merupakan regulator pergerakan spermatozoa (Mbizvo, 1993).

Demikian juga jumlah spermatozoa hidup (viabilitas) memberikan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) antara lapisan atas dengan lapisan bawah namun tidak berbeda nyata

($P>0,05$) antara level perlakuan penambahan Pentoksifilin. Hasil ini diduga disebabkan adanya reaksi positif antara bahan pengencer dengan Pentoksifilin yang memiliki reaksi yang tidak begitu berbeda dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Hasil yang diperoleh berkisar antara 75,17% sampai 84% untuk konsentrasi Pentoksifilin 15 - 25 μM . Jumlah spermatozoa hidup didalam pengencer yang mengandung Pentoksifilin 25 μM (84%) memberikan hasil yang terbaik dibanding kontrol (83,67%) maupun pada level Pentoksifilin 15 μM (79,175) dan 20 μM (75,17%) untuk spermatozoa pada lapisan atas, sedangkan pada lapisan bawah berturut-turut dari nilai tertinggi sampai terendah didapat pada 25 μM (71,50%), 15 μM (69,67%), kontrol (69,67 %) dan 20 μM (60,00%). Penambahan pentoksifilin berhubungan dengan kemampuan antioksidan dalam menangkap senyawa oksigen aktif yang dihasilkan oleh spermatozoa mati, memutus reaksi peroksida dengan cara memutus ion hydrogen bersama elektronnya .

Kelainan yang terjadi pada spermatozoa merupakan penyimpangan morfologi dari kerangka normal spermatozoa. Kelainan ini berpengaruh terhadap fertilitas, sehingga dapat dijadikan ukuran kualitas spermatozoa. Menurut Bearden dan Fuquay (1980), meningkatnya jumlah spermatozoa abnormal menyebabkan progresif motilitas menurun. Tidak ada perbedaan yang nyata antara level pentoksifilin namun ada perbedaan yang nyata antara spermatozoa lapisan atas (6,71%) dan lapisan bawah (16,08%). Secara umum prosentase abnormalitas pada keempat perlakuan masih tergolong rendah dan masih dalam kisaran normal, karena masih di bawah 20%. Hasil tersebut sesuai dengan pendapat Toelehere (1981), bahwa kelainan morfologi di bawah 20% masih dianggap normal.

Hasil pengamatan terhadap keutuhan membrane plasma spermatozoa dengan metode hypoosmotic swelling test (HOST) menunjukkan, bahwa pengaruh level Pentoksifilin terhadap prosentase spermatozoa yang menunjukkan ekor menggelembung (swelling) tidak ada perbedaan ($p>0,05$), namun pengaruh pemisahan spermatozoa terhadap uji

HOST terdapat perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan nilai tertinggi pada lapisan bawah (72,38%) dibanding lapisan atas (65,61%). Menurut Rizal dan Herdis (2008), bahwa spermatozoa yang menunjukkan ekor menggelembung dan melingkar akibat dari uji HOST mengindikasikan bahwa spermatozoa dalam keadaan baik. Hal ini disebabkan membrane plasmanya masih utuh. Sebaliknya pada spermatozoa yang menunjukkan gambaran ekor yang lurus adalah pertanda spermatozoa tersebut keadaannya tidak baik (rusak). Hal ini disebabkan oleh spermatozoa yang terexposur di dalam larutan dengan tekanan osmotik yang rendah akan mengakibatkan molekul air masuk ke sel untuk menyeimbangkan perbedaan tekanan osmotik intra dan ekstra seluler. Pada spermatozoa yang membrane plasmanya utuh, air yang masuk, akan tertahan di dalam sel, sampai batas waktu tertentu. Ini menyebabkan meningkatnya tekanan mekanik di dalam sel sehingga mengakibatkan ekor menggelembung, sementara jika membran plasma sel sudah rusak (bocor), air yang masuk ke sel akan keluar kembali dan tidak menyebabkan peningkatan tekanan mekanik di dalam sel sehingga ekor tetap dalam keadaan lurus.

SIMPULAN

Penambahan Pentoksifilin dengan level 25 μM memberikan hasil yang lebih baik dibanding penambahan 15 μM , 20 μM maupun tanpa penambahan pentoksifilin (kontrol) pada seluruh parameter (motilitas, viabilitas, morfologi dan membrane plasma utuh) spermatozoa

Dari hasil pemisahan spermatozoa dengan albumin didapat lapisan atas memberikan hasil terbaik kecuali pada membrane plasma utuh dengan rata-rata angka motilitas (66,67%), viabilitas (80,50%), morfologi (6,71%) dan HOST (65,61%).

DAFTAR PUSTAKA

- Arsyad, K.M. 1981. Spermatogenesis. Prosiding Seminar. Penerbit Pengurus Besar Perkumpulan Andrologi Indonesia (PANDI), Surabaya.
- Bearden, J.H. and W.J. Fuquay.1980. Applied animal Reproduction. Mississippi State

- University. Resto publishing Company, Inc A Prentice Hall Company Reston Virginia.
- Daniel, C., L. Denise, and G. Jean. 1996. Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by percol gradient centrifugation procedures. *Fertility and Sterility*, 65(1):160-164.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma In:Hafez B E.S.E. Hafez (ed). *Reproduction in Farm Animal*. 7 th ed Philadelphia (US); Lippincot Williams and Wilkins. P. 96-109.
- Hafez, E.S.E. 1987. *Reproduction in Farm Animal*. Hafez E.S.E. and 5 th ed Lea & Febiger, Philadelphia.
- Kay, V.J., J.R. Coutts, and L. Robertson. 1994. Effect of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosome reaction. *Human Reproduction* 9(12):2318-2323.
- Malmgren, L. and H.R. Martinez. 1996. Change in sperm motility and plasma membrane integrity in equine spermatozoa after storage under different conditions. Presented by 13th international congress on animal reproduction poster session. pp 24-26.
- Mbizvo, M.T., R.C. Johnson, and G.H.W. Baker. 1993. The effects of the motility stimulants, caffeine, pentoxifyllin, and 2-deoxyadenosine on hyperactivation of cryopreserved human sperm. *Fertility and Sterility*, 59 :1112 -1117.
- Mustofa, M.S.2002. *In Vitro Effect of the Administration of Pentoxifylline on Activating Factor the ATPase Activity of semen of Normozoospermia and Astenozoospermia*. Department of Biology, Yarsi University School of Medicine. Jakarta
- Pang, S.C., P.J.Chan, and A. Lu .1993. Effects of pentoxifyllin on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertility and Sterility* 60: 336 -343
- Pedersen, J.A and D.W. Fawcett. 1976. Functional anatomy of human spermatozoa in Hafez E.S.E eds. *Human semen and fertility regulation in Man* St Louis The CV Mosby, 65-74.
- Sikka S.C. and Hellstrom. 1990. Functional evaluation and motility parameters of pentoxifylline stimulated cryopreserved human sperm. *Arta* 1 :309-319.
- Soderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different-thawing procedures. *Theriogenology*. Vol 48. No 7, pp 115-1126.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1989. *Prinsip dan Prosedur Statistika (Terjemahan)*, Edisi Kedua, Penerbit P.T Gramedia, Jakarta.
- Sumadiasa, L. 1999. Peran Pentoksifilin dan atau vitamin E terhadap Motilitas dan Masa Aktif Spermatozoa Kambing PE sebelum dan setelah simpan dingin dan simpan Beku. Thesis. Universitas Airlangga Surabaya.
- Tournaye, H. 1994. The effect of pentoxifylline on sperm function and embryonic development and its use in the treatment of male-factor infertility. Thesis. Vrije Universiteit Brussel, Belgium.
- Wang, R., S.C. Sikka, K. Veeraragavan, M. Bell, and W.J.G. Hellstrom. 1993. Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. *Fertility and Sterility*. 60:711-715.
- Windsor, D. P., G. Evans, and I.G. White, 1993. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: A Review. *Reproduction, Fertility and Development* 5: 155-171.
- Yovic, J.L. 1993. Pentoxifylline : Action and application in assisted reproduction. *Human reproduction* 8: 1786-1791.
- Yuliani, E. 2000. *Pemisahan spermatozoa dengan metode Swim up dan kombinasi Swim up dengan Asid migration pengaruhnya terhadap rasio kromosom seks (Studi eksperimental untuk menghasilkan embrio sapi Bali jantan)*. (Disertasi). Program Pasca sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Yuliani, E., A. Eddy, dan H.Y. Lukman. 2012. *Skim Penelitian Prioritas Nasional Masterplan Percepatan dalam Mewujudkan Nusa Tenggara Barat Bumi Sejuta Sapi*

(NTB-BSS). 2011. Laporan Penelitian
Perluasan Pembangunan Ekonomi
Indonesia 2011-2025 (PENPRINAS
MP3EI 2011-2025)