

Verifikasi molekuler metode sexing sperma sapi dengan kolom BSA (Bovine Serum Albumin)

Molecular verification of sperm sexing method with BSA (Bovine Serum Albumin) column

EKAYANTI MULYAWATI KAIIN[✉], MUHAMMAD GUNAWAN, SENLIE OCTAVIANA, SUKMA NUSWANTARA

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl Raya Jakarta Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8754587, Fax: +62-21-8754588, ✉email: ekayantimk@yahoo.com

Manuskrip diterima: 24 Agustus 2016. Revisi disetujui: 26 April 2017.

Abstrak. Kaiin EM, Gunawan M, Octaviana S, Nuswantara S. 2017. Verifikasi molekuler metode sexing sperma sapi dengan kolom BSA (Bovine Serum Albumin). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 3: 241-245*. Penentuan jenis kelamin anak sapi merupakan salah satu langkah strategis dalam perkembangan teknologi inseminasi buatan. Metoda pemisahan spermatozoa pembawa kromosom jenis kelamin betina (X) atau jantan (Y) dengan kolom BSA telah menghasilkan keberhasilan kesesuaian jenis kelamin anak sapi yang di lapangan sebesar 76% sampai 89%. Tujuan dari penelitian ini ialah memverifikasi hasil pemisahan sperma pembawa kromosom X dan kromosom Y dengan metode kolom BSA (Bovine Serum Albumine) secara molekuler. Sperma sexing sapi Simmental yang telah dipisahkan kromosom X dan Y dengan kolom BSA 5% (sperma X) dan 10% (sperma Y), diuji kualitas sperma secara mikroskopis meliputi parameter motilitas, viabilitas dan abnormalitas sperma. DNA sperma pada masing-masing kolom (5% atau 10%) diekstraksi menggunakan metoda spin-column dan kemudian diamplifikasi menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan design primer gen Sex-determining Region Y (SRY) yang berada pada daerah kromosom Y dan gen autosomal GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) pada daerah HMG Box (High Mobility Group Box). Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas sperma X dan Y sebesar 60-70%, viabilitas sperma X sebesar 76,9-80,1% dan sperma Y sebesar 75,5-77,7%, sedangkan abnormalitas sperma X sebesar 6,4-7,6% dan sperma Y sebesar 5,2-5,5%. Hasil pemisahan sperma pada kolom BSA konsentrasi 10% dan sperma yang tidak disexing (kontrol), terverifikasi adanya 2 pita yaitu gen SRY (318 bp) dan GAPDH (415 bp). Hal ini menunjukkan bahwa pada kolom BSA 10% terdapat lebih banyak sperma Y. Hasil pada kolom BSA 5%, hanya terdapat 1 pita GAPDH (415 bp), menunjukkan sperma pada kolom tersebut adalah sperma X. Hasil ini menunjukkan bahwa sexing sperma sapi dengan metoda kolom BSA 5% dan 10%, dapat terverifikasi secara molekuler memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y yang diuji dengan menggunakan metode duplex PCR.

Kata kunci: Sexing, sperma, BSA, PCR, SRY

Abstract. Kaiin EM, Gunawan M, Octaviana S, Nuswantara S. 2017. *Molecular verification of sperm sexing method with BSA (Bovine Serum Albumin) column. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 3: 241-245*. Determining the sex of cattle was a strategic step in the development of artificial insemination technology. Separation of sperm carriers female sex chromosome (X) or male sex chromosome (Y) methods with a BSA column has produced successful sex-matched calves after Artificial Insemination (AI) by 76% to 89%. The aim of this study was to verify the results of sperm separation with a BSA column method based on molecular technique. Simmental sperm was separated with 5% BSA column (X sperm) and 10% BSA column (Y sperm). Sperm quality was tested microscopically with parameters: motility, viability, sperm abnormalities and intact membrane plasma (IMP). DNA of sperm from each column was extracted using spin-column method and was then amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) with the designed primer of the primary genes of Sex-Determining Region Y (SRY) located in the region of the Y chromosome and autosomal GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene in the area of HMG Box (High Mobility Group Box). The results showed that the X and Y sperm motility was 60-70%, X sperm viability was 76,9-80,1%, whereas Y sperm was 75,5-77,7%. X sperm abnormality was 6,4-7,6% and Y sperm was 5,2-5,5%. The results showed that sperm separation with 10% BSA and non sexed sperm (control) revealed two molecular bands that were verified as SRY gene (318 bp) and GAPDH gene (415 bp). This indicates that the 10% BSA column contained more Y sperm than X sperm. In 5% BSA column only one band was formed in gel electrophoresis at 415 bp (GAPDH), it showed that only contain X sperm. The methods to separated bull sperm (sexing) using BSA column 5% and 10% can be verified molecularly by duplex PCR to distinguish between X chromosome and Y chromosome in bull sperm.

Keywords: sexing, sperm, BSA, PCR, SRY

PENDAHULUAN

Penentuan jenis kelamin pedet memegang peran penting dalam produksi bibit unggul ternak sapi untuk

memperoleh jumlah, jenis serta mutu genetik yang unggul. Metode pemisahan jenis kelamin sperma (sexing) pada sapi telah berhasil memisahkan spermatozoa pembawa kromosom X yang akan menghasilkan pedet sapi perah

betina untuk memproduksi susu sebagai *replacement* induk superior (Taylor 2005) dan sperma pembawa kromosom Y yang akan menghasilkan pedet sapi potong jantan bakalan untuk penggemukan (Said et al. 2005). Berbagai metode sexing sperma telah dilakukan, salah satunya dengan menggunakan alat flowsitometer. Alat sexing sperma tersebut menghasilkan akurasi jenis kelamin sperma X dan Y sebesar 90-95% (Seidel Jr. 2003; 2007). Namun terdapat beberapa kendala penggunaan alat tersebut di Indonesia, selain harga alat yang sangat mahal, jumlah dosis straw yang dihasilkan juga sedikit. Hal tersebut tentunya akan berpengaruh terhadap nilai ekonomis dari straw sperma sexing yang dihasilkan dan harganya akan sulit dijangkau oleh peternak rakyat di Indonesia.

Pengembangan metode pemisahan jenis kelamin spermatozoa sapi yang telah dilakukan di Puslit Bioteknologi LIPI adalah dengan menggunakan kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) 5-10% (Kaiin et al. 2007). Metode ini dikembangkan dengan harapan dapat menjawab tantangan penerapan teknologi sexing sperma di peternak di Indonesia. Aplikasi IB dengan sperma sexing di beberapa daerah di Indonesia, telah berhasil mencapai kesesuaian jenis kelamin anak sapi di lapangan sebesar 76-89 % (Said et al. 2005 ; Kaiin et al. 2007 ; Kaiin et al. 2008, Gunawan et al. 2015). Seiring dengan pengembangan metode sexing sperma dengan kolom BSA 5-10% dan untuk lebih menyakinkan hasil aplikasi IB di lapangan, maka perlu dilakukan verifikasi secara molekuler. Verifikasi dilakukan terhadap metode sexing dengan kolom BSA 5-10% untuk meningkatkan validasi hasil IB dengan sperma sexing di lapangan.

Pembuktian atau verifikasi pemisahan jenis kelamin sperma dapat dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang dapat menentukan kemurnian DNA sampel dengan menggunakan primer tertentu. Gen *Sex-determining Region Y* (SRY) yang berada pada daerah kromosom Y merupakan gen penentu jenis kelamin jantan pada sperma. Prashant et al. (2015) menyatakan bahwa amplifikasi gen SRY merupakan alat yang penting untuk menentukan jenis kelamin. Gen SRY berada di daerah non rekombinan pada kromosom Y dan memiliki exon tunggal yang mengkode 204 asam amino. Struktur gen SRY tersebut memiliki daerah sentral yang berkorelasi dengan HMG (*homeobox*) atau disebut dengan *housekeeping gene* (pada mamalia disebut dengan GADPH) yang memiliki daerah konservatif yang dapat membedakan antar spesies. Karakteristik SRY-HMG inilah yang biasa digunakan untuk penelitian DNA berbasis penentuan jenis kelamin (Taylor 2005 ; Choi et al. 2009 ; Trigal et al. 2012 ; Gokulakrishnan et al. 2015).

Keuntungan amplifikasi menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) gen SRY adalah relatif mudah, cepat, akurat dan terjangkau dari segi biaya (Pomp et al. 1995) dibandingkan dengan sexing sperma menggunakan alat flowsitometer. Penelitian Fu et al. (2007) dan Shi et al. (2007) menyatakan bahwa *duplex* PCR mampu mengamplifikasi DNA secara simultan menggunakan primer ganda untuk mencegah hasil yang bias apabila di dalam sampel tidak ada fragment Y (gen SRY). Meskipun demikian, *duplex* PCR tersebut hanya

bisa mendeteksi DNA pada mamalia tertentu dan belum banyak dilaporkan pada sapi (Shende et al. 2014 ; Prashant et al. 2015). Tujuan penelitian ini adalah memverifikasi spermatozoa pembawa kromosom X dan Y yang telah dipisahkan dengan menggunakan kolom BSA konsentrasi 5-10 % secara molekuler dan untuk membuktikan metode *duplex* PCR dapat dilakukan dengan menggunakan primer pendek SRY dan GADPH secara bersama-sama.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan bahan penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan (RPKSH), Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Sampel sperma hasil sexing dengan kolom BSA 5-10% yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari 3 ekor sapi pejantan Simmental di 3 lokasi yaitu Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Balai Inseminasi Buatan (BIB) Nasional, Lembang, Jawa Barat dan Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Tuah Sakato, Kota Payakumbuh, Sumatera Barat.

Metode penelitian

Koleksi semen dan uji kualitas sperma

Semen sapi pejantan Simmental dikoleksi dengan metode vagina buatan. Hasil koleksi kemudian diamati kualitas makroskopis dan mikroskopisnya. Semen yang memenuhi standar kualitas baik, kemudian diproses untuk dilakukan sexing sperma dengan kolom BSA 5-10% selama 45 menit (Kaiin et al. 2013). Setelah proses sexing, sperma yang dikoleksi dari masing-masing kolom BSA 5% (sperma X/betina) dan 10% (sperma Y/jantan) kemudian disentrifugasi di dalam medium *Brackett Oliphant* (BO) selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Pelet sel sperma kemudian ditambahkan dengan 1000 ul medium BO dan diamati kualitas spermanya secara mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, membran plasma utuh dan abnormalitas. Pengamatan parameter tersebut dilakukan untuk setiap 100 sel sperma dari 5 lapang pandang, dengan masing-masing 3 kali ulangan.

Ekstraksi DNA

Sebanyak 10 juta sel/mL sperma diekstraksi dengan metoda *spin column* menggunakan AccuPrep® *Genomic Extraction Kit* (Bioneer K-3032, Korea) sesuai instruksi kerja yang terdapat pada kit tersebut. Total DNA sperma yang diperoleh, kemudian disimpan di dalam freezer -20 °C sampai dilakukan tahap berikutnya.

Amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total DNA sperma yang telah diekstraksi, kemudian diamplifikasi menggunakan metode *Duplex* PCR dengan total volume 20 µl yang mengandung 50 ng DNA, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 10 pmol primer per sampel, 1 Unit *Tag Polimerase AmpONE™ Tag premix* (GeneAll 521-200) dan *nuclease free water* (Applied Biosystem AM 9937) hingga mencapai total volume tersebut. Dua pasang primer

yang digunakan adalah SRY F 5' AAGGGGAGAACAGTTAGGGAGAG 3'; SRY R 5' ATCGGGTTGCATAGTATTGAAG 3' ; GADPH F 5' GTGGCGCCAAGA GGGTC ATCATC 3' ; GADPH R 5' GGTTTCTCCAGGCGGCAGGT 3' (Bioneer). Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Mastercycle Gradient* (Eppendorf). Program PCR terdiri dari predenaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *extention* 72°C selama 30 detik dengan siklus berulang 45 kali. Setelah itu, siklus berakhir dengan *final extention* 72°C selama 10 menit dan diikuti dengan *hold time* pada suhu 4°C (Taylor 2005).

Elektroforesis

Produk PCR kemudian dianalisis dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa 3% menggunakan pewarna *SYBr* (Invitrogen S7563, Amerika Utara). Penanda molekular (*Ladder*, Vivantis NL 1407) yang berukuran 100 bp dielektroforesis bersama untuk menentukan ukuran produk PCR tersebut. Selanjutnya, gel hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan *Gensys gel documentation system* dan ukuran *amplicon* ditentukan menggunakan *software* yang telah tersedia dalam *geldoc* tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan kualitas sperma sapi Simmental hasil koleksi di 3 lokasi ditampilkan pada Tabel 1. Semua sapi pejantan yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kualitas makroskopis semen yang sesuai dengan kondisi normal. Volume semen sapi yang dihasilkan dalam kisaran normal adalah 1-15 mL, warna semen sapi normal adalah putih susu atau krem dengan nilai pH antara 6,2 sampai 7,5. Derajat kekentalan mencerminkan konsentrasi sperma, konsistensi kental dan warna krem menunjukkan kisaran jumlah sperma sebesar 1.000 sampai 2.000 juta sel per mL (Toelihere 1993).

Hasil pengujian kualitas mikroskopis spermatozoa sapi ditampilkan pada Tabel 2. Berdasarkan data pada Tabel 2., konsentrasi sel sperma pada 3 sapi pejantan Simmental berada dalam kisaran normal yaitu 300-2.500 juta sel/mL. Hal tersebut tampak sesuai dengan derajat konsistensinya. Gerakan massa menunjukkan kualitas semen berdasarkan motilitasnya, pada penelitian ini sampel sperma memiliki nilai yang sangat baik yaitu +2 dan +3 (Arifiantini 2012). Motilitas sapi pejantan fertil adalah 50-80% dengan penilaian dalam skala 0-5 motil progresif (Toelihere 1993). Pada penelitian ini, motilitas sperma sapi Simmental hasil koleksi sebesar 70-75% dengan viabilitas dan MPU di atas 70%. Proses sexing sperma memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan proses produksi straw semen beku tanpa sexing. Oleh karena itu sangat penting untuk memeriksa kualitas sperma sapi sebelum sexing. Proses pemisahan jenis kelamin sperma X dan Y yang dilakukan dengan kolom BSA 5-10% memerlukan waktu sekitar 45-60 menit lebih lama dibandingkan dengan proses pembekuan semen biasa. Hanya sperma dengan motilitas $\geq 60\%$ yang digunakan dalam proses sexing dengan kolom

BSA 5-10% (Kaiin et al. 2013), supaya pada saat pembekuan sperma masih dalam kondisi motilitas dan viabilitas yang layak untuk diproses lebih lanjut dan menghasilkan kualitas sperma post thawing motility (PTM) yang sesuai dengan SNI produk sperma sapi beku yaitu motilitas $\geq 40\%$.

Sebelum proses pembekuan sperma sexing, perlu dilakukan evaluasi terhadap kualitas sperma sexing. Kualitas sperma sapi Simmental setelah disexing dengan metoda kolom BSA 5-10% pada penelitian ini ditampilkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil pada Tabel 3, tampak bahwa proses sexing tidak mempengaruhi kualitas mikroskopis sperma sapi Simmental yang disexing. Hal tersebut menunjukkan bahwa sperma sexing tersebut layak untuk diproses pembekuan. Kualitas sperma sexing sebelum pembekuan sangat penting dalam menentukan keberhasilan IB di lapangan. Menurut Rota et al. (2000 dalam Malik et al. 2011), selain kemurnian sampel sexing, motilitas dan integritas membran juga merupakan faktor yang penting pada ketahanan hidup sel dan kemampuan fertilisasi pada sapi.

Literatur mengenai koleksi DNA dengan metoda *spin colum* belum ditemukan, tetapi pada penelitian ini dibuktikan bahwa koleksi DNA dari sampel sperma dapat digunakan dengan metoda spin column, yang dibuktikan dengan diperolehnya hasil berupa pita yang terekspresi pada gel Agarose. Metoda *spin column* ini relatif lebih mudah untuk diaplikasikan dalam mengkoleksi DNA yang berasal dari sperma.

Hasil elektroforesis DNA sperma dari masing-masing kolom BSA 5% dan BSA 10% ditampilkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Kualitas makroskopis sperma segar sapi Simmental hasil koleksi di 3 lokasi penelitian

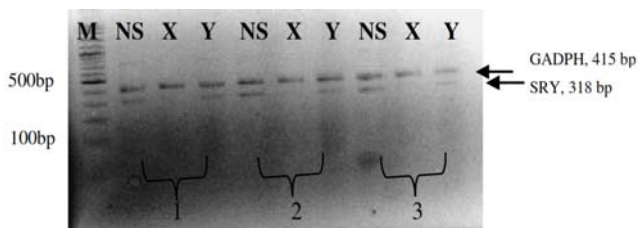
| Parameter | BIBD Tuah Sakato | BIB Lembang | P2 Bioteknologi LIPI Cibinong |
|-------------|------------------|-------------|-------------------------------|
| Volume (mL) | 9 | 7,5 | 7 |
| Warna | Krem | Krem | Krem |
| Bau | Khas | Khas | Khas |
| Konsistensi | Kental | Kental | Sedang |
| pH | 6-7 | 6,5 | 6-7 |

Tabel 2. Kualitas mikroskopis sperma segar sapi Simmental hasil koleksi di 3 lokasi penelitian

| Parameter | BIBD Tuah Sakato | BIB Lembang | P2 Bioteknologi LIPI Cibinong |
|-----------------------------|------------------|-------------|-------------------------------|
| Konsentrasi (x juta sel/mL) | 1.551 | 1.740 | 1.478 |
| Gerakan massa | +3 | +2 | +2 |
| Motilitas (%) | 75 | 75 | 70 |
| Viabilitas (%) | 75,4 | 70,3 | 80,1 |
| Abnormalitas (%) | 10,3 | 7,3 | 6,63 |
| Membran plasma Uth (%) | 71,2 | 77,7 | 71,4 |

Tabel 3. Kualitas mikroskopis sperma sapi Simmental X dan Y hasil sexing di 3 lokasi penelitian

| Parameter | BIB Tuah Sakato | | BIB Lembang | | P2 Bioteknologi LIPI Cibinong | |
|------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| | BSA 5% (sperma X) | BSA 10% (sperma Y) | BSA 5% (sperma X) | BSA 10% (sperma Y) | BSA 5% (sperma X) | BSA 10% (sperma Y) |
| Motilitas (%) | 60 | 60 | 70 | 70 | 60 | 60 |
| Viabilitas (%) | 77,5 | 77,3 | 80,1 | 77,7 | 76,9 | 75,5 |
| Abnormalitas (%) | 7,6 | 5,5 | 6,4 | 5,6 | 7,4 | 5,2 |
| MPU (%) | 71,7 | 70,3 | 74,2 | 72,8 | 73,6 | 71,8 |



Gambar 1. Hasil elektroforesis sampel sperma sapi Simmental sexing dengan kolom BSA 5-10%. Keterangan: M = marker, NS = non sexing, X = sperma X (kolom BSA 5%), Y = sperma Y (kolom BSA 10%). 1= sampel dari BIBD Tuah Sakato, 2 = sampel dari BIB Lembang, 3 = sampel dari P2 Bioteknologi LIPI Cibinong

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa sperma yang dikoleksi dari kolom BSA 5% (sperma X) hanya mempunyai 1 pita pada 415 bp, sedangkan pada sperma yang dikoleksi dari kolom BSA 10% (sperma Y) dan sperma yang tidak disexing menghasilkan 2 pita pada 415 bp dan 318 bp (Gambar 1) pada semua sampel yang dikoleksi dari 3 lokasi penelitian. Pita pada 415 bp menunjukkan gen GAPDH, sedangkan pita pada 318 bp menunjukkan gen SRY. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode *duplex* PCR yang digunakan dalam penelitian ini mampu memverifikasi hasil pemisahan spermatozoa kromosom X dan kromosom Y pada kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) 5% dan 10%. Metode tersebut sensitif menentukan gen SRY di dalam sampel sperma yang dikoleksi dari masing-masing kolom BSA. Hal ini juga menunjukkan bahwa pada kolom BSA 10% terdapat lebih banyak sperma Y, sedangkan pada kolom BSA 5% terdapat lebih banyak sperma X. Penelitian Malik et al. (2011) memisahkan jenis kelamin sperma dengan medium mukus vagina menghasilkan rasio sperma X sebesar 58,33% , sedangkan pemisahan menggunakan gradien Percoll 45-90% menghasilkan persentase sperma Y sebesar 56,67%. Sperma Y memiliki kecepatan yang lebih tinggi sehingga pada pemisahan dengan kolom BSA, lebih banyak sperma Y yang terlebih dahulu mencapai kolom BSA 10%. Hasil ini sesuai dengan gambaran pada hasil elektroforesis bahwakolom BSA 10% menunjukkan gen SRY yang terekspresi pada sampel dari kolom tersebut.

Hasil penelitian Prashant et al. (2008) menggunakan sampel darah sapi jantan dan betina juga menunjukkan hasil yang sama yaitu terbentuknya 2 pita GAPDH (218 bp) dan SRY (122 bp) pada sampel darah sapi jantan. Hasil

penelitian ini menunjukkan bahwa multiplikasi SRY-GADPH mampu membedakan jenis kelamin dari sampel DNA sperma dan amplifikasi GADPH dapat digunakan sebagai kontrol positif untuk semua sampel. Selain itu, tampak bahwa primer GADPH tidak mempengaruhi amplifikasi kromosom Y. GAPDH merupakan *housekeeping gene* sebagai kontrol positif yang menentukan bahwa amplifikasi PCR berjalan dengan baik. Merupakan suatu keuntungan dengan menggunakan 2 target primer pendek yang dapat dibedakan sekitar 100 bp (Prashant et al. 2008), sehingga dapat dibedakan secara jelas hasil elektroforesis yang diperoleh. Menurut Taylor (2005), metode PCR dapat digunakan untuk mendeterminasi rasio jenis kelamin pada sperma dan embrio. Chandler (1998 dalam Taylor 2005) melakukan penelitian untuk mengevaluasi variasi jenis kelamin sperma pada ejakulat dan menemukan perbedaan yang nyata pada persentase sperma Y pada masing-masing ejakulat. Hal tersebut, juga tampak pada ketebalan pita SRY pada masing-masing sampel. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya perlu dilakukan untuk menentukan kuantitas DNA sperma Y pada masing-masing kolom BSA 10%.

Metode sexing sperma sapi dengan metoda kolom BSA 5% dan 10% dapat terverifikasi secara molekuler memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y. Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya di lapangan, yang menunjukkan keberhasilan kesesuaian jenis kelamin anak sapi yang dilahirkan di atas 80%.

Pemisahan jenis kelamin sperma sapi (sexing) menggunakan metode kolom BSA 5-10% dapat diverifikasi secara molekuler menghasilkan sperma X pada kolom BSA 5% dan sperma Y pada kolom BSA 10%. Metode *duplex* PCR menggunakan gen SRY (318 bp) dan GAPDH (415 bp) mampu membedakan jenis kelamin dari DNA sperma sapi Simmental hasil sexing yaitu sperma X pada kolom BSA 5% dan sperma Y pada kolom BSA 10%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada pimpinan dan staf Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Jawa Barat dan Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Tuah Sakato, Sumatera Barat atas ijin dan kerjasamanya dalam pengambilan sampel penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan. PT Penerbit IPB Press, Bogor.
- Choi SG, Bae MS, Lee ES, Kim SO, Kim BK, Yang JH, Jeon CE, Kim HH, Hwang YJ, Lee ES and Kim DY. 2009. Amplification of Porcine SRY Gene for Sex Determination. *Asian-Austr J Anim Sci* 22 (8): 1107-1112.
- Fu Q, Zhang M, Qin WS, Lu YQ, Zheng HY, Meng B, Lu SS, Lu KH. 2007. Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology* 68: 1211-1218.
- Gokulakrishnan P, Kumar RR, Sharma BD, Mendiratta SK, Malav O, Sharma D. 2015. Determination of Sex Origin of Meat and Meat Prodct on DNA Basis: A Review. *Clin Rev Food Sci Nutr* 55: 1303-1314.
- Gunawan M, Kaiin EM, Said S. 2015. Aplikasi inseminasi buatan dengan sperma sexing dalam meningkatkan produktivitas sapi di peternakan rakyat. *Pros Sem Nas Masy Biod Indon* 1 (1): 93-96.
- Kaiin EM, Gunawan M, Tappa B. 2007. Aplikasi IB dengan sperma hasil pemisahan di Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner* 2007. .
- Kaiin EM, Said S, Tappa, B. 2008. Kelahiran anak sapi hasil fertilisasi secara *in vitro* dengan sperma hasil pemisahan. *Media Peternakan* 31 (1): 22-28.
- Kaiin, EM, Gunawan M, Afiati F, Said S, Tappa B. 2013. Production of frozen sexing sperm separated with BSA column method with standardized on artificial insemination center. *Proceedings International Conference on Biotechnology 2012*. Bogor, 13-14 November 2012.
- Malik A, Haron AW, Yusoff R, Bukar M, Kasim A, Sabri M. 2011. Verification od X-and Y-spermatozoa separation by nested polymerase chain reaction (PCR), motility and membrane integrity in bovine. *African J Biotechnol* 10 (85): 19796-19801.
- Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or 11 pig embryos. *J Anim Sci* 73: 1408-1415.
- Prashant, Gour DS, Dubey PP., Jain A, Gupta SC, Joshi BK, Kumar D. 2008. Sex determination in 6 bovid species by duplex PCR. *J Appl Genet* 49 (4): 379-381.
- Said S, Kaiin EM, Tappa B. 2005. Produksi anak sapi potong dan sapi perah berjenis kelamin sesuai harapan. *Prosiding Seminar Nasional Industri Peternakan Modern II*. Puslit Bioteknologi LIPI, Mataram.
- Seidel Jr GE. 2003. Economic of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598.
- Seidel Jr. GE. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68: 443-446.
- Shende AM., Kutty VHM, Ramteke SS, Ghosh SK., Prasad JK, Bhure SK. 2014. Moleculer cloning and expression of buffalo SRY gene: A mammalian sex determination protein. *Indian J Biotechnol* 13: 364-369.
- Shi L, Yue W, Ren Y, Lei F, Zhao J. 2007. Sex determination in goat by amplification of the HMG Box using duplex PCR. *Anim Rep Sci* 105: 398-403.
- Taylor TM. 2005. Comparing calf sex ratio and semen sex ratio determined by conventional PCR. [Thesis]. The Interdepartmental Program In Animal and Dairy Sciences. Southern Arkansas University, Arkansas.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Cetakan ke-10. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Trigal B, Gomez E., Caamano JN, Munoz M, Moreno J, Carrocera S, Martin D, Diez C. 2012. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Therionology* 78: 1465-1475.