

PENGARUH KONSENTRASI ANTIOKSIDAN *GENISTEINE* TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI PERANAKAN ONGOLE SELAMA PROSES PENYIMPANAN SUHU DINGIN

Chairdin Dwi Nugraha, Diajeng Doyu Pangestu, dan Suyadi Suyadi*

Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

*Email korespondensi: suyadi@ub.ac.id

Abstrak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kadar Genistein optimal yang digunakan dalam pengencer *Tris Aminomethane* kuning telur pada semen Sapi Peranakan Ongole (PO) yang disimpan pada suhu dingin 5°C, diamati pada 0, 24, 48, 72 jam. Bahan yang digunakan adalah semen segar sapi PO. Semen diencerkan menjadi empat perlakuan yaitu P0 (tanpa penambahan Genistein), P1 (penambahan Genistein 10 µM), P2 (penambahan Genistein 30 µM), P3 (penambahan Genistein 50 µM). Variabel diamati berdasarkan motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa. Metode yang digunakan adalah eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan genistein pada semua perlakuan yang disimpan selama 72 jam memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas individu. Semua perlakuan dengan penambahan genistein pada 0, 24, 48 jam berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa. Hasil abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa semua perlakuan genistein pada 48 jam berpengaruh nyata ($P < 0,05$). Perlakuan P0, P1, P2, P3 berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap integritas membran sel spermatozoa pada jam ke 0 dan 72. Penambahan genistein 30 µM merupakan perlakuan terbaik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin (5°C).

Kata kunci: antioxidant, ongole grade, reactive oxygen species, pengenceran semen, tris aminomethane

Abstract. The purpose of this research was to determine the effect of optimal levels of Genistein used in egg yolk *Tris Aminomethane* diluent in Ongole Grade (OG) semen stored at a cold temperature of 5°C, observed at 0, 24, 48, 72 hours. The material used fresh semen of OG cattle. Semen was diluted into P0 (without the addition of Genistein), P1 (Genistein: 10µM), P2 (Genistein: 30µM), P3 (Genistein: 50µM). The variables were observed based on motility, viability, abnormalities and membrane integrity of spermatozoa. The method used was experiments with completely randomized design. The results of the analysis showed that the addition of genistein in all treatments stored for 72 hours gave a significant effect ($P < 0.05$) on the individual motility. All treatments with the addition of genistein at 0, 24, 48 hours had a significant effect on viability ($P < 0.05$). All treatment of genistein at 48 hours has a significant effect ($P < 0.05$) on abnormalities. The treatment P0, P1, P2, P3 had a significant effect ($P < 0.05$) on the integrity membrane of the spermatozoa cell at 0 and 72 hours. The addition of 30 µM genistein (P2) has the best treatment for the quality of spermatozoa during cold storage at 5°C.

Keywords: antioxidant, ongole grade bull, reactive oxygen species, semen diluent, tris aminomethane

Pendahuluan

Sapi Peranakan Ongole (PO) merupakan hasil persilangan antara pejantan Ongole dengan sapi lokal Indonesia dan mulai banyak dibudidayakan di Indonesia (Supartini dan Darmawan, 2014). Sapi PO selain dipelihara untuk tujuan penghasil daging dan juga digunakan sebagai sapi kerja. Keunggulan sapi PO yaitu mampu beradaptasi terhadap kondisi lingkungan, memiliki sifat reproduksi yang baik karena mampu bereproduksi dengan cepat, serta persentase karkas dan kualitas daging yang baik (Muthiaprani *et al.*, 2019). Pengembangan populasi sapi peranakan Ongole (PO) dilakukan dengan program Inseminasi Buatan (IB). Tujuan Inseminasi Buatan (IB) yaitu untuk meningkatkan mutu genetik ternak menggunakan semen sapi dari pejantan unggul dengan memenuhi persyaratan teknis dan kesehatan hewan.

Semen yang berkualitas tinggi merupakan faktor dasar yang menentukan keberhasilan program IB, dikarenakan semen memiliki pengaruh pada keberhasilan induk bunting dan memberikan kontribusi genetik terhadap keturunan yang dihasilkan. Pentingnya jumlah semen yang dihasilkan oleh seekor pejantan yang meliputi volume produksi per tahun (Suyadi *et al.*, 2020), konsistensi produksi sepanjang tahun atau musim (Nugraha *et al.*, 2020) maka kualitas semen sangat penting untuk dijadikan sebagai kriteria dalam menentukan keberhasilan program inseminasi buatan (Muthiapriani *et al.*, 2019; Novianti *et al.*, 2020). Pelaksanaan IB juga perlu memperhatikan deposisi semen, pengetahuan peternak dalam ketepatan mendeteksi birahi dan fisiologi betina (Setiono dkk., 2015).

Proses pendinginan semen baik secara fisik maupun kimia akan meningkatkan produksi senyawa *reactive oxygen species* (ROS) (Hussain *et al.*, 2011). Rizal dan Herdis (2010) kerusakan spermatozoa ditimbulkan karena penanganan proses pendinginan yang kurang tepat. ROS diproduksi secara alamiah dalam metabolisme seluler yang bersifat sangat reaktif dan hasil pengoksidasi turunan dari oksigen. Membrane plasma sperma memiliki fosfolipid yang mengandung asam lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap radikal bebas (Azawi dan Hussein, 2013). Bentuk dan ciri kerusakan sel sperma akibat peroksidasi lipid adalah menurunnya kapasitas fertilisasi, motilitas, kerusakan enzim intraseluler dan kerusakan struktur membrane plasma (Guthrie dan Welch, 2012).

Usaha untuk mempertahankan kualitas fisik dan kimia semen adalah dengan melakukan pengenceran menggunakan bahan pengencer (Wulandari, 2017). penyimpanan semen pada suhu rendah 4 - 5°C dapat terjadi suatu proses yang disebut cekaman dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membrane plasma sel spermatozoa dan akrosom spermatozoa akibat perubahan pada integritas kromatin spermatozoa, sehingga dalam pengencer semen perlu ditambahkan berbagai zat untuk menghindari kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Khalifa dan Lymberopoulos, 2013). Zat yang dapat ditambahkan ke dalam pengencer yaitu antioksidan.

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai kemampuan mereduksi, menekan reaksi radikal bebas. Sehingga antioksidan melindungi sistem biologi terhadap suatu efek yang berpotensi dapat menyebabkan oksidasi pada sel (Rizal dan Herdis, 2010). Genistein merupakan isoflavone yang termasuk dalam fitoestrogen yang banyak ditemukan pada kedelai. Sebagai senyawa isoflavone, memiliki sifat-sifat potensial penting dalam perkembangan sel seperti sebagai antioksidan, anti-inflammatory, anti virus, anti bakteri, dan aktivitas pharmacological terhadap diabetes dan metabolisme lemak (Rassu *et al.*, 2019; Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

Penggunaan genistein masih terbatas pada proses pengenceran semen pada mamalia khususnya bidang peternakan. Penelitian ini menganalisis pengaruh konsentrasi antioksidan *genisteine* terhadap kualitas semen sapi PO (Peranakan Ongole) selama proses penyimpanan suhu dingin. Hasil penelitian ini memberikan referensi yang dapat digunakan pada lokasi IB yang cukup jauh karena spermatozoa dapat bertahan 2-4 hari.

Materi dan Metode Penelitian

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di UPT PT & HMT (Unit Pelaksana Teknis Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak) Tuban mulai bulan Maret sampai April 2021.

Materi Penelitian

Semen segar sapi PO dengan umur sapi yaitu 4 tahun dan memiliki bobot badan 449,4 kg. Sapi dipelihara secara intensif dengan *Standard Operational Procedure* (SOP) yang berlaku di UPT PT & HMT Tuban. Interval penampungan semen segar dilakukan 1 kali per minggu. Semen segar dengan motilitas individu diatas 70% yang digunakan dalam penelitian ini. Bahan pengencer dasar yang digunakan dalam penelitian adalah pengencer *Tris Amonomethane* kuning telur dengan penambahan antioksidan genistein (Sigma Aldrich).

Metode Penelitian

Metode penelitian yaitu eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengamatan dilakukan pada jam ke- 0, 24, 48 dan 72. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Variabel yang diamati meliputi motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran. Perlakuan pada penelitian meliputi:

P0: Semen segar + Pengencer dasar *Tris Aminomethane*

P1: Semen segar + Pengencer dasar *Tris Aminomethane* + konsentrasi Genistein 10 μ M

P2: Semen segar + Pengencer dasar *Tris Aminomethane* + konsentrasi Genistein 30 μ M

P3: Semen segar + Pengencer dasar *Tris Aminomethane* + konsentrasi Genistein 50 μ M

Integritas Membran

Uji integritas membran spermatozoa menggunakan teknik Hypo Osmotic Swelling Test (HOST) mengikuti prosedur yang dilaporkan sebelumnya (Zubair *et al.*, 2013). Larutan HOST memiliki komposisi 1,35 g Fruktosa dan 0,55 g Natrium Sitrat dalam 100 ml air suling dengan tekanan 150 mOsm/L. Sebanyak 0,5 ml semen ditambahkan 1 ml larutan HOST, inkubasi dalam waterbath pada suhu 37°C selama 30 menit (Zubair *et al.*, 2013). Satu tetes semen segar diletakkan pada obyek glass, dibiarkan kering udara kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis One-Way ANOVA dengan menggunakan software SPSS 24.

Hasil dan Pembahasan

Kualitas semen segar sapi Peranakan Ongole

Data kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini termasuk normal dan diatas standar (Tabel 1). Volume dan pH semen yang dihasilkan pejantan masuk dalam kategori normal, Arifiantini (2012) menyatakan bahwa volume semen pejantan dapat mencapai 5 - 8 mL per ejakulasi sedangkan pH antara 6,2 - 6,8 (Adhitama 2018). Konsistensi semen kuat dipengaruhi oleh umur pejantan. Pejantan muda umumnya memiliki konsistensi lebih encer dibandingkan pejantan dewasa (Luthfi, dkk 2020). Nilai motilitas massa spermatozoa (+++) dengan ciri terlihat gelombang besar dan tebal yang bergerak aktif dan cepat (Susilawati, 2011).

Motilitas individu sapi PO pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian Adhitama (2018) yaitu sebesar 69,04%. Pejantan dengan fertilitas semen yang baik harus memiliki persentase jumlah abnormalitas kurang dari 20% (Dewi dkk., 2012). Sedangkan semen segar yang boleh diproses menjadi semen beku harus memiliki nilai persentase spermatozoa hidup normal antara 60% - 75% (Garner and Hafez, 2000).

Tabel 1. Kualitas Semen Segar Sapi Peranakan Ongole (PO)

Parameter	Rata-rata ± SD
Makroskopis	
Volume (mL)	5,3 ± 2,06
pH	6,7 ± 0,15
Konsistensi	Sedang
Warna	Putih kekuningan
Bau	Khas semen
Mikroskopis	
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	75 ± 5,77
Konsentrasi 10 ⁶ /ml	1480 ± 302,43
Viabilitas (%)	83,56 ± 7,43
Abnormalitas (%)	2,63 ± 1,51
Integritas membran (%)	68,26 ± 2,06

Motilitas individu sapi PO setelah proses pendinginan

Penambahan antioksidan genistein (10 µM, 30 µM, 50 µM) yang disimpan pada suhu dingin 5 °C selama 72 jam memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas individu spermatozoa. Penambahan genistein 30 µM memiliki nilai rata-rata motilitas individu tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Perlakuan P0 (tanpa penambahan genistein) dapat mempertahankan semen pada suhu 5°C pada jam ke 0. Perlakuan P1 dan P3 dapat mempertahankan kualitas semen sampai 48 jam. Perlakuan P2 dapat mempertahankan kualitas semen sampai 72 jam. Sehingga penambahan genistein 30 µM merupakan perlakuan terbaik yang mampu mempertahankan motilitas individu sampai 72 jam. Nilai persentase motilitas individu sapi PO setelah proses pendinginan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase Motilitas Individu Semen Sapi PO Setelah Proses Pendinginan

Perlakuan	Motilitas individu jam ke-			
	0	24	48	72
P0	55±5 ^a	34±4,18 ^a	32±2,74 ^a	29±2,24 ^a
P1	54±4,18 ^a	44±4,18 ^b	41±4,18 ^b	36±4,18 ^b
P2	63±2,74 ^b	52±4,47 ^c	47±4,47 ^c	44±5,48 ^c
P3	51±4,18 ^a	43±2,74 ^b	40±3,54 ^b	36±2,24 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Hasil penelitian ini lebih rendah dari penelitian Prihantoko *et al.* (2020) nilai motilitas $68.13 \pm 0.75\%$ dengan penambahan genistein 1 µM dan $69.25 \pm 0.50\%$ dengan penambahan genistein 2 µM. Perbedaan ini kemungkinan terjadi akibat perbedaan prosedur penelitian dan konsentrasi genistein yang diberikan. Widjaya (2011) menambahkan bahwa konsentrasi spermatozoa dalam pengencer dasar mampu menurunkan motilitas individu karena metabolisme yang terjadi pada sperma berikatan erat dengan jumlah sperma yang hidup. Selain itu antioksidan juga bertindak sebagai pencegah reaksi antara radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel spermatozoa (Waluwanja, 2019).

Viabilitas sapi PO setelah proses pendinginan

Nilai persentase viabilitas spermatozoa sapi peranakan ongole (PO) setelah proses pendinginan dapat dilihat pada tabel 3. Penambahan antioksidan genistein (10 µM, 30 µM, 50 µM) yang disimpan pada suhu dingin 5 °C selama 48 jam memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa. Penambahan genistein 30 µM memiliki nilai rata-rata viabilitas tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Perlakuan P0 (tanpa penambahan genistein), P1 dan P3 dapat

mempertahankan semen pada suhu 5°C pada jam ke 0 dengan nilai persentase diatas 70%. Perlakuan P2 dapat mempertahankan viabilitas semen sampai 24 jam. Sehingga penambahan genistein 30 µM merupakan perlakuan terbaik yang mampu mempertahankan viabilitas sampai 24 jam penyimpanan dan dapat digunakan untuk IB.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Persentase Viabilitas Semen Sapi PO Setelah Proses Pendinginan

Perlakuan	Viabilitas jam ke-			
	0	24	48	72
P0	74,27±2,72 ^a	66,08±5,61 ^a	62±5,17 ^a	53,05±8,48
P1	82,86±3,89 ^b	67,25±3,87 ^a	64,06±4,33 ^a	57,70±4,33
P2	84,27±2,14 ^b	73,57±1,73 ^b	69,65±2,30 ^b	63,25±5,36
P3	76,20±3,20 ^a	64,57±3,25 ^a	60,41±2,12 ^a	54,89±3,23

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Hasil penelitian ini lebih tinggi dari penelitian Prihantoko *et al.* (2020) nilai viabilitas sebesar 74.90 ± 0.81% dengan kadar genistein 1 µM dan 75.09 ± 0.96% dengan kadar genistein 2 µM. Viabilitas akan menurun apabila dalam waktu simpan panjang ketersediaan energi dalam pengencer berkurang, penurunan pH juga dapat mengakibatkan peningkatan asam laktat hasil metabolisme dan membran akan mengalami kerusakan (Widjaya, 2011). Rusaknya membran plasma dapat menyebabkan cairan intraseluler keluar dan kepala sperma mengalami aglutinasi sehingga sperma tidak mampu melakukan pergerakan. Pereira *et al.* (2010) menambahkan bahwa pada suhu rendah selama penyimpanan spermatozoa mengalami destabilisasi dan kerusakan membrane plasma karena transisi atau perubahan fase fluida ke fase mirip gel.

Abnormalitas sapi PO setelah proses pendinginan

Nilai persentase abnormalitas spermatozoa sapi peranakan ongole (PO) setelah proses pendinginan dapat dilihat pada tabel 4. Penambahan antioksidan genistein (P0, P1, P2, P3) yang disimpan pada suhu dingin 5 °C pada jam ke-0, 24, dan 72 tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap abnormalitas spermatozoa, namun berpengaruh nyata (P<0,01) pada semua perlakuan pada jam ke-48. Perlakuan P2 memiliki nilai abnormalitas paling rendah dibandingkan perlakuan lain sehingga P2 menjadi perlakuan terbaik selama penyimpanan suhu dingin 5 °C.

Tabel 4. Persentase Abnormalitas Semen Sapi PO Setelah Pendinginan

Perlakuan	Abnormalitas Jam Ke-			
	0	24	48	72
P0	6,52±0,90	9,03±1,05	9,85±0,99 ^b	11,12±0,47
P1	5,67±0,56	9,18±1,75	9,61±0,64 ^b	11,24±0,70
P2	5,58±0,92	7,27±0,89	8,29±1,05 ^a	10,14±0,91
P3	6,64±1,26	9,14±1,25	10,71±1,03 ^b	11,43±0,80

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05).

Abnormalitas disebabkan karena akibat kelainan morfologi spermatozoa akibat faktor primer dan sekunder. Nilai abnormalitas yang tinggi dapat dipengaruhi oleh preparat ulas, dimana pada saat pembuatan preparat ulas diduga terjadi kesalahan dalam mengulas, seperti terlalu kuat dalam menekan semen dan pada saat menghomogenkan *eosin negrosin* dengan semen. Hal ini mengakibatkan terputusnya bagian kepala atau ekor (Susilawati, 2011). Kerusakan *acrosomal* pada kepala spermatozoa mempengaruhi ketika ejakulasi dan menjadikan ternak steril, sedangkan kerusakan leher dapat diakibatkan karena stress atau cekaman panas yang mengakibatkan kepala dan ekor terpisah (Putranti dkk., 2010).

Integritas membran sapi PO setelah proses pendinginan

Nilai persentase integritas membran spermatozoa sapi peranakan ongole (PO) setelah proses pendinginan dapat dilihat pada tabel 5. Penambahan antioksidan genistein (P0, P1, P2, P3) yang disimpan pada suhu dingin 5 °C pada jam ke-0 dan 72 memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap integritas membran spermatozoa. Nilai integritas membran diatas 60% hanya terdapat pada perlakuan P2 jam ke-0. Penambahan konsentrasi genistein 30 μM merupakan yang terbaik, namun hanya mampu mempertahankan pada jam ke-0.

Tabel 5. Persentase Integritas Membran Semen Sapi PO Setelah Pendinginan

Perlakuan	Integritas Membran Jam Ke-	
	0	72
P0	59,14 \pm 4,37 ^a	32,64 \pm 2,09 ^a
P1	58,61 \pm 4,37 ^a	40,49 \pm 4,01 ^b
P2	67,80 \pm 1,07 ^b	51,05 \pm 4,79 ^c
P3	57,06 \pm 4,33 ^a	43,17 \pm 5,08 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$).

Nilai integritas membran dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian Prihantoko, et al. (2020) sebesar $47.01 \pm 0.91\%$ dengan kadar genistein 1 μM dan $46.22 \pm 0.74\%$ dengan kadar genistein 2 μM . Apabila membran spermatozoa berfungsi dengan baik, maka spermatozoa yang terexpose di dalam larutan dengan tekanan osmotik mengakibatkan molekul air masuk ke dalam sel untuk menyeimbangkan perbedaan tekanan intra dan ekstraseluler, namun apabila membran spermatozoa rusak maka yang terjadi spermatozoa tidak dapat menyesuaikan tekanan osmotiknya (Rodiah dkk., 2015).

Kesimpulan

Penambahan antioksidan genistein 30 μM dalam pengencer Tris Aminomethane kuning telur yang disimpan pada suhu dingin 5 °C mampu mempertahankan motilitas individu dan abnormalitas selama 72 jam penyimpanan, viabilitas selama 24 jam penyimpanan, integritas membrane penyimpanan selama jam ke-0. Hasil penelitian perlu dipraktekkan pada Inseminasi Buatan (IB) di lapangan sehingga dapat diketahui manfaatnya.

Ucapan Terima Kasih

Ibu Dr. Ir. Indyah Aryani, MM. Selaku kepala UPT PT & HMT Tuban yang telah mengijinkan dan menyediakan pejantan sapi PO. Bapak M. Zaini dan Bapak A. Nuryadin yang telah membantu dalam proses penampungan materi semen.

Daftar Pustaka

- Adhitama, E. 2018. Perbedaan Produksi Semen Segar, Recovery Rate, Semen Beku Sapi Simmental dan Sapi Peranakan Ongole Di Balai Inseminasi Buatan Ungaran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Arifiantini, RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen Pada Ternak. IPB press. Bogor.
- Azawi, OI, EK Hussein. 2013. Effect of Vitamins C or E Supplementation to Tris Diluent on the Semen Quality of Awassi Rams Preserved at 5 °C. *Vet. Res. Forum.* 4(3): 157-60.
- Dewi, AS, YS Ondho, dan E Kurnianto. 2012. Kualitas Semen Berdasarkan Umur Pada Sapi Jantan Jawa. *Animal Agriculture Journal.* 1(2): 126 –133.
- Garner, DL and ESE Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: ESE Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animal.* 7th. ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia: 96-106.
- Guthrie, HD, GR Welch. 2012. Effects of Reactive Oxygen Species on Sperm Function. *Theriogenol.* 78:1700-1708.



- Hussain, SA, C Lessard, M Anzar. 2011. Quantification of Damage at Different Stages Of Cryopreservation Of Endangered North American Bison (Bison Bison) Semen and The Effects Of Extender and Freeze Rate On Post-Thaw Sperm Quality. *Anim. Reprod. Sci.* 129 (3-4): 171-9.
- Khalifa, T and A Lymberopoulos. 2013. Changeability of Sperm Chromatin Structure During Liquid Storage of Ovine Semen in Milk-Egg Yolk-and Soybean Lecithin-Based Extenders and Their Relationships to Field-Fertility. *Cell and Tissue Banking*. 14(4), 687–698.
- Luthfi, M, L Affandhy, D Ratnawati. 2020. Karakteristik Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Tingkat Umur yang Berbeda di Loka Penelitian Sapi Potong. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner Virtual*. 113-123.
- Muthiapriani, L, E Herwijanti, I Novianti, A Furqon, WA Septian, S Suyadi. 2019. The Estimation Of Semen Production Based On Body Weight And Scrotal Circumference On PO Bull At Singosari National Artificial Insemination Center. *J. Anim. Sci.* 29 (1): 1.
- Novianti, I, B Purwantara, E Herwijanti, CD Nugraha, RF Putri, A Furqon, WA Septian, S Rahayu, VMA Nurgiantiningsih, S Suyadi. 2020. Effect of Breeds On Semen Characteristics Of Aged Bulls In The Indonesian National Artificial Insemination Center. *J. Anim. Sci.* 30 (2): 1.
- Nugraha, CD, N Widodo, K Kuswati, S Suyadi. 2020. Potential Semen Quality Rate of Ongole Crossbred Bulls at Cattle Breeding Station (UPT PT & HMT) Tuban - Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, The 3rd International Conference of Animal Science and Technology*. Makassar, Indonesia.
- Prihantoko, KD, F Yuliasuti, H Haniarti, A Kusumawati, DT Widayati, A Budiyanto. 2020. The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade Bull Semen Based on Skim Milk – Soy Lecithin Extender. *International Conference Improving Tropical Animal Production for Food Security*. 1-10.
- Putranti, OD, Kustono, Ismaya. 2010. Pengaruh Penambahan Crude Tannin Pada Sperma Cair Kambing Peranakan Ettawa Yang Disimpan Selama 14 Hari Terhadap Viabilitas Spermatozoa. *Buletin Peternakan*. 34(1): 1-7.
- Rassu, G, EP Porcu, S Fancello, A Obinu, N Senes, G Galleri, R Migheli, E Gavini, P Giunchedi. Intra Nasal Delivery Of Genistein-Loaded Nanoparticles As a Potential Preventive System Against Neurodegenerative Disorders. *Pharmaceutics*. 11 (1): 8.
- Rizal, M dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa*. 20 (3): 139-145.
- Rodiah, E, AD Yuliani, C Dradjat, Arman. 2015. Efektifitas Kinerja Pentoksifilin Terhadap Kualitas dan Integritas Membran Plasma Utuh pada Sperma Sapi Bali Hasil Pemisahan dengan Menggunakan Albumin. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia*, 1 (1) : 70-76.
- Setiono, N, S Suharyati dan PE Santosa. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman Dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(2) : 61-69.
- Sharifi-Rad, J, C Quispe, M Imran, A Rauf, M Nadeem, TA Gondal, B Ahmad, M Atif, MS Mubarak, O Sytar, OM Zhilina, ER Garsiya, A Smeriglio, D Trombetta, DG Pons, M Martorell, SM Cardoso, AFA Razis, U Sunusi, D Calina. 2021. Genistein: An Integrative Overview Of Its Mode Of Action, Pharmacological Properties, And Health Benefits. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 3268136: 1-36.
- Supartini, N dan H Darmawan. 2014. Profil Genetik dan Peternakan Sapi Peranakan Ongole Sebagai Strategi Dasar Pengembangan Desa Pusat Bibit Ternak. *Buana Sains*. 14 (1): 71-84.
- Susilawati, T. 2011. Spermatology. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- Suyadi, S, B Purwantara, A Furqon, WA Septian, I Novianti, IW Nursita, CD Nugraha, RF Putri, H Pratiwi, E Herwijati. 2020. Influences of Bull Age And Season On Sperm Motility, Sperm Concentration, And Ejaculate Volume Of Ongole Grade Cattle In Singosari National Artificial Insemination Center. *J. Indonesian. Trop. Anim. Agric.*, 45 (4): 261-267.
- Waluwanja, YUD, WM Nalley, TM Hine, K Uly. 2019. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Minyak Zaitun Ekstra Virgin (Oleum Olivae) dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Babi Duroc. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 6 (2) : 55-62.
- Widjaya, N. 2011. Efek Penambahan Vitamin E dalam Pengencer Glukosa Fosfat terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Domba pada Suhu 5 °C. *Sains Peternakan*, 9 (1): 25-31.
- Wulandari, SNLI. 2017. Kualitas Semen Sapi *Friesian Holstein* (FH) Selama Penyimpanan Suhu Dingin Menggunakan Pengencer Andromed dengan Penambahan Filtrat Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) *Merry*). Universitas Brawijaya. Malang.
- Zubair, M, LA Lodhi, E Ahmad. 2013. Hypo Osmotic Swelling Test As Screening For Evaluation Of Semen Of Bull. *J. Entomol. Zool. Stud*. 1: 124–128.