

Kualitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* setelah Pemberian Pakan Tersuplementasi Taoge (*Phaseolus radiatus L.*)

The Sperm Quality of *Polled* Bali Bull Following Bean Sprout (*Phaseolus radiatus L.*) Supplemented Feeding Treatments

Sri Gustina^{1*}, Hasbi Hasbi², Herry Sonjaya², Sudirman Baco², Husnul Qhatimah², Wandu Saputra²,
Mutmainna Mutmainna², Ekayanti Mulyawati Kaiin³, Tulus Maulana³

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Sulawesi Barat, Majene,
Sulawesi Barat, Indonesia

²Departemen Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar,
Sulawesi Selatan, Indonesia

³Research Center for Applied Zoology, Research Organization for Life Science, National Research and
Innovation Agency (BRIN), West Java, Indonesia

*Email: srigustinasain@gmail.com

Naskah diterima: 24 Juni 2023, direvisi: 26 Januari 2024, disetujui: 14 Maret 2024

Abstract

The study aimed to increase the sperm quality of *polled* Bali bulls with the supplementation of bean sprouts (*Phaseolus radiatus L.*) in feeding. This research used two *polled* Bali bulls aged 5 to 6 years that were fed by bean sprouts-supplemented rations twice a week for two months with each feeding amounting to 1 kg/bull. Semen was collected using the artificial vagina method. The evaluation macroscopic of semen was volume while the microscopic evaluation such as motility, viability, abnormality, plasma membrane integrity (PMI), acrosome integrity, and DNA fragmentation. The result of this research showed that semen volume and spermatozoa abnormality of fresh semen after feeding of bean sprouts were not significantly different ($P>0.05$) compared to before feeding, but motility and viability were significantly higher ($P<0.01$). Motility and acrosome integrity of frozen semen were not significantly different ($P>0.05$) while viability and PMI were significantly higher ($P<0.01$), and abnormality and DNA Fragmentation were significantly lower ($P<0.01$) after feeding compared to before. The research revealed that the supplementation of bean sprouts could increase the motility and viability but had no effect on the volume and abnormality of fresh semen. Meanwhile, in frozen semen, it increased viability and PMI and decreased abnormality and DNA fragmentation but had no effect on motility and acrosome integrity.

Keywords : bean sprout; motility; *polled* Bali bulls; sperm; viability.

Abstrak

Penelitian ini bertujuan meningkatkan kualitas spermatozoa sapi Bali *polled* dengan pemberian pakan suplemen taoge (*Phaseolus radiatus L.*). Penelitian dilakukan menggunakan dua ekor pejantan sapi Bali *polled* yang berumur 5 sampai 6 tahun dan diberikan pakan taoge dua kali seminggu sebanyak 1 kg/ekor selama dua bulan. Koleksi semen menggunakan metode vagina buatan. Evaluasi makroskopis meliputi volume sedangkan evaluasi mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), dan fragmentasi DNA. Hasil penelitian menunjukkan volume semen dan abnormalitas spermatozoa semen segar sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dibandingkan dengan sebelum pemberian, namun motilitas dan viabilitas nyata lebih tinggi ($P<0,01$) setelah pemberian dibandingkan dengan sebelum pemberian. Motilitas dan tudung akrosom utuh semen beku sapi Bali *polled* tidak

berbeda nyata ($P>0,05$) sebelum dan setelah pemberian taoge, namun viabilitas dan membran plasma utuh nyata lebih tinggi ($P<0,01$) setelah pemberian dibandingkan dengan sebelum pemberian, sedangkan abnormalitas dan fragmentasi DNA nyata lebih rendah ($P<0,01$). Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian taoge mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa semen segar, namun tidak mampu meningkatkan volume dan abnormalitas. Pada semen beku, pemberian taoge meningkatkan viabilitas dan membran plasma utuh, menurunkan abnormalitas dan fragmentasi DNA, namun tidak meningkatkan motilitas dan tudung akrosom utuh.

Kata kunci : Motilitas; sapi Bali *polled*; sperma; taoge; viabilitas

Pendahuluan

Sapi Bali merupakan keturunan banteng (*Bos sondaicus*) dan telah tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Keberadaan sapi asli Indonesia ini sangat penting dalam penyediaan kebutuhan daging masyarakat. Sapi Bali memiliki beberapa keunggulan diantaranya adalah Tingkat reproduksi yang tinggi, kematian anak yang rendah, memiliki daya adaptasi yang baik terhadap lingkungan, dan Produksi karkas yang tinggi (Purwantara *et al.*, 2012)), fertilitas dapat mencapai 83% tanpa terpengaruh kualitas pakan (Utomo *et al.*, 2017). Saat ini telah ditemukan sapi Bali tidak bertanduk (*polled*). Sapi Bali *polled* merupakan sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara alami, namun memiliki karakteristik yang sama dengan sapi Bali bertanduk (Hasbi *et al.*, 2021). Berdasarkan observasi yang dilakukan, varian sapi Bali *polled* pertama kali dikenal pada awal tahun 1980-an. Sapi ini berasal dari peternakan komersial di Kabupaten Sidrap (Bila United Livestock). Dalam rentang waktu 1985-1986, Universitas Hasanuddin mendirikan sebuah peternakan mini di Pattalassang Kabupaten Gowa untuk memulai studi mengenai sapi Bali *polled* (Baco *et al.*, 2020).

Tidak adanya tanduk memberikan kemudahan manajemen pemeliharaan yang dapat dikaitkan dengan produktivitas daging, seperti mengurangi resiko terjadinya memar pada daging yang dapat disebabkan oleh adanya tanduk (Hasbi *et al.*, 2021). Akan tetapi, libido, persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Bali *polled* lebih rendah dibanding sapi Bali bertanduk (Hasbi *et al.*, 2021; Gustina *et al.*, 2022). Lebih lanjut Uswa *et al.* (2022) melaporkan tidak ada perbedaan konsentrasi hydrogen peroksida (H_2O_2), motilitas, membran plasma utuh, dan abnormalitas, namun viabilitas

lebih tinggi pada semen beku sapi Bali *polled* dibandingkan sapi Bali bertanduk.

Kuantitas dan kualitas semen seekor pejantan sangat ditentukan oleh status nutrisi. Singh *et al.*, (2018) melaporkan bahwa manajemen pakan dan nutrisi yang baik akan berdampak pada sekresi hormon gonadotropin dan Kesehatan reproduksi. Selain itu, faktor lain yang dapat mempengaruhi produksi semen seekor pejantan adalah umur, musim, suhu, dan kelembaban udara (Murphy *et al.*, 2018) serta bangsa (Lemma dan Shemsu, 2015). Lebih lanjut Syarifuddin (2021) menjelaskan bahwa status gizi mengontrol produksi sperma, sekresi gonadotropin dan perkembangan seksual pejantan. Oleh karena itu salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk memperbaiki status gizi adalah dengan penambahan pakan suplemen berupa Taoge (*Phaseolus radiatus* L.). Taoge merupakan kecambah yang berasal dari biji kacang hijau yang kaya akan protein sebab selama proses perkecambahan terbentuk bermacam-macam asam amino esensial yang merupakan penyusun protein (Sades *et al.*, 2016). Selain itu, kaya akan kandungan vitamin E, C, dan selenium yang merupakan senyawa antioksidan alami. Kombinasi vitamin E, C dan selenium dapat melindungi berbagai sel di dalam tubuh dari oksidasi radikal bebas, termasuk sel sperma. Basir *et al.* (2013), melaporkan bahwa pemberian kecambah kacang hijau pada mencit meningkatkan konsentrasi spermatozoa. Hal yang sama dilaporkan oleh Diartha *et al.* (2016) bahwa pemberian ekstrak taoge berpengaruh positif meningkatkan motilitas dan jumlah spermatozoa pada mencit. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya, penelitian pemberian pakan suplemen Taoge (*Phaseolus radiatus* L.) pada sapi Bali *polled* untuk meningkatkan kualitas semen merupakan

hal yang pertama dilakukan dan perlu dikaji lebih mendalam.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan dua ekor pejantan sapi Bali *polled* berumur 5 sampai 6 tahun yang diberi pakan tersuplementasi taoge dua kali seminggu selama dua bulan dengan setiap pemberian sebanyak 1 kg/ekor.

Koleksi, Pengolahan, dan Evaluasi Semen

Koleksi semen dilakukan dengan metode vagina buatan untuk selanjutnya dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume sedangkan evaluasi mikroskopis meliputi persentase motilitas, viabilitas dan Abnormalitas (Arifiantini, 2012), membran plasma utuh (MPU) (Priyanto *et al.*, 2015), tudung akrosom utuh (TAU) (Cahya *et al.*, 2017), dan fragmentasi DNA (Handayani *et al.*, 2021). Semen yang memenuhi syarat diencerkan menggunakan Andromed[®]. Selanjutnya dilakukan proses pengemasan dan ekuilibrisasi pada suhu 4-5°C selama 3 jam. *Pre freezing* dan proses pembekuan dilakukan mengacu pada metode yang digunakan oleh Rangkuti *et al.*, (2021). Setelah proses pembekuan dan *thawing*, kembali dilakukan evaluasi secara mikroskopis untuk mengetahui kualitas spermatozoa *post-thawing*.

Evaluasi Kualitas Semen Segar

Evaluasi kualitas semen segar dilakukan sesaat setelah semen penampungan. Evaluasi yang dilakukan meliputi makroskopis yaitu volume dan mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

Volume Semen. Volume merupakan jumlah semen segar dalam satuan mililiter per ejakulasi. Volume semen segar diukur dengan melihat skala pada tabung.

Motilitas Spermatozoa. Evaluasi motilitas spermatozoa dilakukan dengan mengacu pada metode yang digunakan sebelumnya oleh Priyanto *et al.*, (2015). Penilaian ditentukan dengan melihat jumlah pergerakan spermatozoa hidup dan bergerak maju/progresif yang nilainya berkisar antara 0-100%. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan meneteskan

25µl larutan NaCl dan semen pada *object glass* kemudian ditutup menggunakan *cover glass* dan selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

Viabilitas Spermatozoa. Evaluasi viabilitas spermatozoa dilakukan dengan mengacu pada metode yang digunakan sebelumnya oleh Priyanto *et al.*, (2015). Satu tetes semen yang diletakkan pada ujung *object glass* dicampur dengan satu tetes larutan eosin-nigrosin. Campuran tersebut kemudian dibuat preparate ulas dan dikeringkan di atas *heating table*, selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop. Spermatozoa yang hidup (tidak berwarna) dan mati (berwarna ungu). Evaluasi viabilitas dilakukan pada 5 kali lapangan pandang atau minimal 200 sel spermatozoa. Persentase spermatozoa hidup dihitung menggunakan rumus:

Spermatozoa hidup (%) =

$$\frac{\text{Jumlah Spermatozoa Hidup}}{\text{Jumlah Total Spermatozoa yang Dihitung}} \times 100\%$$

Abnormalitas Spermatozoa. Evaluasi abnormalitas spermatozoa menggunakan pewarna *Sperm Stein Ready to USE MICROPTIC S.L.* (N1: hexamethyl-p-roseniline methanolic solution, N2: xanthene buffered solution, dan N3: Thiazine buffered solution). Evaluasi abnormalitas dilakukan pada 5 kali lapangan pandang atau minimal 200 sel spermatozoa. Spermatozoa abnormal ditandai dengan kelainan pada kepala, leher, dan ekor. Persentase abnormalitas spermatozoa dihitung dengan rumus (Cahyadi *et al.*, 2016):

Abnormalitas spermatozoa (%) =

$$\frac{\text{Jumlah Sperma abnormal}}{\text{Sperma yang diamati}} \times 100\%$$

Evaluasi Kualitas Semen Beku

Semen beku di-*thawing* dalam air hangat yang bersuhu 37°C selama 30 detik sesuai dengan metode Sukmawati *et al.*, (2014). Semen yang telah di-*thawing* dimasukkan ke dalam *microtube*. Evaluasi *post-thawing* yang dilakukan meliputi pemeriksaan motilitas, viabilitas, abnormalitas, Membran Plasma Utuh (MPU), Tudung Akrosom Utuh (TAU) dan Fragmentasi DNA. Prosedur pengujian

motilitas, viabilitas dan abnormalitas mengikuti prosedur yang sama pada evaluasi kualitas semen segar.

Membran Plasma Utuh (MPU).

Membran plasma utuh dievaluasi menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test)*. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop Olympus CX33 dengan kamera EP50 dengan pembesaran 200 kali. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggembung sebagai upaya untuk mempertahankan keutuhan membrannya, sedangkan spermatozoa yang membran plasmanya tidak utuh ditandai dengan ekor yang lurus. Evaluasi MPU dilakukan pada 5 kali lapangan pandang atau minimal 200 sel spermatozoa. Perhitungan persentase MPU dilakukan dengan rumus (Priyanto *et al.*, 2015)

MPU (%) =

$$\frac{\text{Total spermatozoa yang bereaksi}}{\text{Total spermatozoa yang bereaksi+tidak bereaksi}} \times 100\%$$

Tudung Akrosom Utuh (TAU). Evaluasi tudung akrosom utuh dilakukan dengan mengacu pada metode yang digunakan oleh Cahya *et al.*, (2017) dengan modifikasi. Evaluasi TAU dilakukan dengan pewarnaan eosin 2%. Semen beku yang sudah *dithawing* selama 30 detik pada suhu 37°C dimasukkan ke dalam *tube eppendorf*, kemudian diambil dan dicampurkan dengan eosin 2% dengan perbandingan 1:4. Selanjutnya dibuat preparat ulas tipis pada *object glass* dan dikeringkan di atas *heating table*. Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop Olympus CX33 dengan kamera EP50 (Japan). Tudung akrosom dinilai utuh apabila $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{2}{3}$ bagian anterior kepala berwarna lebih gelap dari bagian posterior (Priyanto *et al.*, 2015). Evaluasi TAU dilakukan pada 5 kali lapangan pandang atau minimal 200 sel spermatozoa. Persentase tudung akrosom dihitung menggunakan rumus (Ichwandi, 2004):

TAU (%) =

$$\frac{\text{Spermatozoa bertudung akrosom utuh}}{\text{Spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Fragmentasi DNA. Evaluasi fragmentasi DNA dilakukan menggunakan pewarna *acridine orange* (AO) dengan mengacu pada metode

yang digunakan sebelumnya oleh Adiputra *et al.* (2022). Sampel semen diulas di atas gelas objek kemudian difiksasi dalam larutan *Carnoy* selama 2 jam selanjutnya dibilas menggunakan aquades. Setelah itu, direndam dalam pewarna AO selama 12 jam kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop *fluorescence* (Zeiss Axio Imager A2 dengan digital camera Zeiss AxioCam HRc, Germany). Spermatozoa yang terfragmentasi akan memancarkan warna orange, sedangkan spermatozoa yang tidak terfragmentasi akan menghasilkan warna hijau. Evaluasi fragmentasi DNA dilakukan pada 5 kali lapangan pandang atau minimal 200 sel spermatozoa. Perhitungan persentase kerusakan DNA spermatozoa dilakukan dengan cara (Handayani *et al.*, 2021):

Fragmentasi DNA (%) =

$$\frac{\text{Jumlah Spermatozoa dengan warna orange (rusak)}}{\text{Jumlah Total Spermatozoa yang Dihitung}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji T (*T-Test Dependent Sample*) untuk membandingkan kualitas semen beku sapi pejantan Bali *polled* yang diberi pakan tambahan taoge dan tanpa pemberian pakan tambahan. Penampungan dan evaluasi serta produksi semen beku dilakukan sebanyak 4 kali dan dihitung sebagai ulangan dalam penelitian ini.

Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Segar Sapi Bali *Polled* yang Diberi Pakan Suplemen Taoge

Kualitas semen segar sapi Bali *polled* yang diberi pakan suplemen taoge tercantum pada Tabel 1 sebagai berikut.

Volume Semen

Volume semen merupakan salah satu parameter uji yang digunakan untuk mengetahui volume semen sapi pejantan dalam satu kali ejakulat (Komariah *et al.*, 2020). Volume semen sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan sebelum pemberian taoge (Tabel 1). Hal ini

Tabel 1. Kualitas semen segar sapi Bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge (*Phaseolus radiatus L.*)

Parameter	Perlakuan	
	Sebelum Pemberian Taoge	Setelah Pemberian Taoge
1. Volume (ml)	4,25 ± 1,28	5,45 ± 1,98
2. Motilitas (%)	64,37 ± 1,76 ^a	73,12 ± 3,72 ^b
3. Viabilitas (%)	92,32 ± 1,43 ^a	95,3 ± 1,4 ^b
4. Abnormalitas (%)	5,09 ± 0,72	4,6 ± 0,82

^{a, b} Superskip huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P<0,05).

diduga pemberian taoge belum cukup untuk meningkatkan volume semen sapi Bali *polled*. Hal yang berbeda dilaporkan oleh Nurcholis *et al.*, (2015) pada domba garut bahwa pemberian limbah taoge dan suplementasi Omega-3 dapat meningkatkan volume semen. Volume semen yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan yang dilaporkan sebelumnya yaitu berkisar 5,5±0,88 ml - 6,9±0,78 ml (Fazrien *et al.*, 2020), 6,32 ml (Indriastuti *et al.*, 2020) dan 6.44 mL (Nabilla *et al.*, 2018) pada sapi Bali.

Motilitas

Motilitas spermatozoa merupakan jumlah pergerakan spermatozoa yang bergerak progresif yang diberi nilai 0-100%. Gebreyasus *et al.*, (2021) menjelaskan bahwa motilitas spermatozoa memiliki korelasi positif dengan kemampuan fertilitas seekor pejantan. Motilitas spermatozoa semen segar sapi Bali *polled* yang diberi taoge pada penelitian ini nyata lebih tinggi (P<0,01) dibanding sebelum pemberian taoge. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan antioksidan berupa vitamin C dan E yang ada pada Taoge. Vitamin C dan E merupakan antioksidan yang dapat menghambat atau mencegah pembentukan radikal bebas sehingga tidak terjadi stress oksidatif pada sel spermatozoa. Manohara (2015) melaporkan bahwa taoge memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi diantaranya vitamin E, vitamin C, fenol, flavonoid, fitosterol dan beberapa mineral.

Persentase motilitas spermatozoa pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan yang telah dilaporkan sebelumnya pada sapi Madura yaitu 55±5,77% (Anastasia *et al.*, 2015) dan sapi Limousin yaitu 58,5±2,24% (Nugroho *et al.*, 2015). Hidayanti *et al.*, (2017) melaporkan bahwa Vitamin E merupakan antioksidan yang dapat melindungi spermatozoa dari berbagai

kerusakan akibat serangan radikal bebas, sehingga dengan adanya vitamin E di dalam taoge ada kemungkinan akan melindungi spermatozoa dari berbagai kerusakan. Hal yang sama telah dilaporkan oleh Khairi *et al.*, (2014) bahwa kombinasi pemberian vitamin E, mineral Selenium dan Zink dapat mengurangi penurunan motilitas spermatozoa sapi Simental.

Viabilitas

Viabilitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa bertahan hidup setelah diencerkan dan merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan kualitas spermatozoa seekor pejantan. Evaluasi viabilitas dilakukan menggunakan pewarna eosin-nigrosin (Gambar 1), spermatozoa hidup tidak menyerap warna dan spermatozoa mati menyerap warna (Agarwal *et al.*, 2022). Viabilitas spermatozoa semen segar sapi Bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge pada penelitian ini yaitu 92,32±1,43% dan 95,3±1,4%. Viabilitas spermatozoa semen segar sapi Bali *polled* yang diberi taoge nyata lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan sebelum pemberian. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan antioksidan dan protein yang terdapat pada taoge. Yuliyantika *et al.*, (2019) mengemukakan bahwa antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan terjadinya kerusakan sel. Beberapa kandungan antioksidan yang tinggi pada tanaman taoge diantaranya 153 mg vitamin E (α tokoferol); 52,08 mg vitamin C dan 8,33 mg besi) (Wijayanti *et al.*, 2013). Protein kacang hijau berkisar 20-25% yang terdiri atas asam amino leusin, arginin, isoleusin, valin, dan lisin (Martianingsih *et al.*, 2016). Asam amino arginin mempunyai peranan penting dalam

sistem imunitas seluler. Selain itu, arginin juga diketahui berperan dalam spermatogenesis. Senyawa ini dapat memblokir dan menahan agen yang menghambat glikolisis pada sel sperma. Hal tersebut dapat mengakibatkan peningkatan aktivitas metabolik hingga mencapai delapan kali lipat. Proses ini akan meningkatkan ketersediaan energi sel sperma dan memperkuat daya tahan hidup spermatozoa. Kekurangan arginin dapat mengacaukan metabolisme sperma sehingga mengakibatkan penurunan viabilitas (Rosandi dan Sjarifanto, 2015).

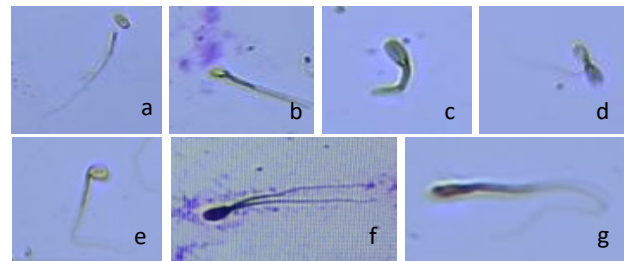


Gambar 1. Viabilitas spermatozoa sapi bali *Polled* (Hitam: spermatozoa hidup; Merah: spermatozoa mati). Pembesaran 200x

Abnormalitas

Abnormalitas merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi baik karena pada proses pembentukan spermatozoa dalam tubulus seminiferus (abnormalitas primer) maupun karena perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan (abnormalitas sekunder) (Arifiantini *et al.*, 2010). Abnormalitas spermatozoa semen segar Sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dibandingkan sebelum pemberian taoge (Gambar 2). Hal ini menunjukkan pemberian taoge seminggu dua kali masing-masing satu kilo belum mampu menurunkan abnormalitas spermatozoa. Ismaya (2014) menyatakan bahwa kualitas semen termasuk rendah dan daya konsepsinya rendah apabila persentase abnormalitasnya lebih dari 20%. Abnormalitas spermatozoa yang mencapai 30-35% dapat mengakibatkan infertilitas. Lebih lanjut Moretti *et al.*, (2022) melaporkan bahwa abnormalitas dapat menjadi penghambat keberhasilan fertilisasi jika persentasinya

tinggi. Soderquist *et al.*, (1991) melaporkan bahwa kelainan atau abnormalitas pada kepala spermatozoa sangat erat hubungannya dengan gangguan fertilitas. Lebih lanjut telah dilaporkan sebelumnya bahwa kejadian kondensasi kromatin yang tidak normal (Johnson, 1997) dan bentuk inti yang tidak normal (Ostermeier *et al.*, 2001) berhubungan erat dengan penurunan fertilitas. Kelainan pada bagian kepala spermatozoa (*pyriform*) dapat mengganggu proses fertilisasi dan kegagalan pembelahan pada perkembangan embrio (Thundathil *et al.*, 1999). Abnormalitas pada penelitian ini sebelum dan setelah pemberian kecambah kacang hijau yaitu $5,09\pm 0,72\%$ dan $4,60\pm 0,82\%$, pada kedua perlakuan menunjukkan abnormalitas yang rendah.



Gambar 2. Abnormalitas spermatozoa semen beku sapi bali *Polled* (a: ekor putus; b: rounded head; c: undeveloped; d: bent tail; e: bent midpiece; f: double tail; g: small head). Pembesaran 200x.

Kualitas Semen Beku Sapi Bali *Polled* yang Diberi Pakan Suplemen Taoge

Kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama proses pembekuan merupakan aspek yang sangat penting untuk seleksi pejantan. Sukmawati *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa selama pembekuan terjadi perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim sehingga akan merusak komposisi lipid membran plasma yang berdampak pada menurunnya motilitas sperma. Selain itu, viabilitas juga dapat menurun sebagai akibat pengencer dan terjadinya perubahan suhu (Len *et al.*, 2019; Indriastuti *et al.*, 2020). Kualitas semen beku Sapi Bali *Polled* sebelum dan setelah pemberian Taoge (*Phaseolus Radiatus* L) disajikan pada Tabel 2.

Motilitas

Motilitas spermatozoa semen beku sapi Bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Hal ini

Tabel 2. Kualitas semen beku sapi bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge (*Phaseolus radiatus L.*)

Parameter	Perlakuan	
	Sebelum Pemberian Taoge	Setelah Pemberian Taoge
1. Motilitas (%)	41,25 ± 3,53	42,50 ± 4,62
2. Viabilitas (%)	76,56 ± 2,49 ^a	87,75 ± 5,08 ^b
3. Abnormalitas (%)	18,09 ± 2,20 ^a	10,05 ± 4,64 ^b
4. Membran Plasma Utuh (%)	78,19 ± 3,23 ^a	86,28 ± 2,91 ^b
5. Tudung Akrosom Utuh (%)	77,10 ± 3,08	79,83 ± 4,63
6. Fragmentasi DNA (%)	9,34 ± 1,34	4,93 ± 1,97

^{a, b} Superskip huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). X

menunjukkan bahwa pemberian taoge dua kali setiap minggu dengan setiap pemberian sebanyak 1 kg/ekor belum mampu meningkatkan motilitas spermatozoa. Persentase motilitas semen beku sapi Bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge pada penelitian ini yaitu 41,25±3,53 dan 42,50±4,62%. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan sebelumnya oleh Gustina *et al.*, (2022) yaitu 45,00±2,04 pada sapi Bali *polled*. Namun demikian, motilitas spermatozoa yang diperoleh pada kedua perlakuan dalam penelitian ini layak untuk digunakan dalam program inseminasi buatan karena memiliki motilitas >40% (BSN, 2017). Motilitas semen *post thawing* memiliki peranan penting karena dapat digunakan sebagai penilaian kemampuan sperma untuk membuahi sel telur dalam pelaksanaan inseminasi buatan (Yahaq *et al.*, 2019). Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kemampuan mitokondria dalam menjalankan fungsinya. Selain itu, perubahan suhu pada saat pembekuan dapat menjadi penyebab kegagalan mitokondria dalam mensintesis ATP (Adenosin Trifosfat) (Sukmawati *et al.*, 2014).

Viabilitas

Viabilitas spermatozoa semen beku sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan sebelum pemberian taoge. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian taoge dapat meningkatkan daya tahan spermatozoa sapi Bali *Polled* selama proses pembekuan. Viabilitas yang tinggi setelah pemberian taoge diduga disebabkan karena kandungan antioksidan yang tinggi sehingga dapat menekan terjadinya radikal bebas dan stress oksidatif yang berujung

pada kematian spermatozoa. Wijayanti *et al.*, (2013) mengemukakan bahwa taoge memiliki kandungan antioksidan yang tinggi diantaranya vitamin E (α tokoferol) dan vitamin C. Persentase viabilitas yang tinggi menandakan bahwa membran plasma masih utuh secara fisik, sehingga organel sel spermatozoa terlindungi, kebutuhan zat-zat makanan dan ion-ion proses metabolisme tersedia. Arsiwan *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa membran plasma berperan melindungi organel pada sitoplasma dan sebagai sarana transportasi elektrolit untuk keberlangsungan metabolisme sel spermatozoa.

Abnormalitas

Abnormalitas spermatozoa semen beku sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan sebelum pemberian taoge. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian taoge dapat menurunkan abnormalitas spermatozoa. Penurunan persentase abnormalitas spermatozoa di duga disebabkan oleh kandungan antioksidan yang terdapat pada taoge diantaranya adalah vitamin C. Vitamin C dalam taoge mampu menekan stress oksidatif sehingga proses spermatogenesis dapat berlangsung normal (Winarsi, 2007; Maruliyanda *et al.*, 2013). Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa sebelum dan setelah pemberian taoge yaitu 18,09±2,20 dan 10,05±4,64%. Meskipun demikian, hasil yang diperoleh pada penelitian ini tergolong masih rendah dan layak untuk digunakan dalam pelaksanaan inseminasi buatan. Novita (2020) mengatakan bahwa abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% menunjukkan adanya infertilitas sehingga tidak dapat digunakan untuk inseminasi buatan.

Membran Plasma utuh

Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggebu, sedangkan yang tidak utuh ditandai dengan ekor yang lurus (Gambar 3). Membran plasma utuh spermatozoa semen beku sapi Bali *polled* setelah pemberian taoge nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan sebelum pemberian taoge. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian taoge dapat mempertahankan keutuhan membran plasma. Persentase membran plasma utuh yang tinggi dengan pemberian taoge diduga karena adanya kandungan vitamin E dan C pada taoge. Vitamin E dan C dapat meminimalkan dampak negatif dari peroksida lipid sehingga keutuhan membran plasma dapat terjaga meskipun telah mengalami proses pembekuan. Kerusakan membran plasma spermatozoa dapat disebabkan oleh proses pembekuan karena perubahan temperatur yang signifikan akan merusak lipoprotein yang ada pada membran plasma (Arifiantini *et al.*, 2005). Lebih lanjut Winarsi (2007) melaporkan bahwa penambahan vitamin E berperan penting dalam memperbaiki stress oksidatif, karena vitamin E merupakan bagian penting bagi pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tak jenuh yang terdapat pada membran seluler dan subseluler, fosfolipid pada mitokondria, retikulum endoplasma serta membran plasma yang memiliki afinitas terhadap α tokoferol, sedangkan vitamin C berperan dalam menghilangkan senyawa oksigen reaktif. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan yang dilaporkan sebelumnya oleh Hasbi *et al.*, (2023)



Gambar 3. Pengamatan membran plasma utuh spermatozoa semen beku sapi bali *Polled* (Hitam: MPU yang utuh; Merah: MPU yang rusak). Pembesaran 200x

pada sapi Bali *Polled* yaitu sebesar $72,43 \pm 7,32$ dan sapi Bali bertanduk sebesar $76,58 \pm 6,53$.

Tudung Akrosom Utuh

Evaluasi tudung akrosom spermatozoa penting dilakukan karena keutuhan tudung akrosom harus tetap terjaga agar dapat melakukan kapasitas yang berpengaruh terhadap keberhasilan proses fertilisasi (Ahammad *et al.*, 2013). Evaluasi TAU dilakukan menggunakan pewarnaan eosin 2% (Gambar 4). Persentase tudung akrosom utuh spermatozoa semen beku sapi Bali *polled* sebelum dan setelah pemberian taoge pada penelitian ini tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini menunjukkan pemberian taoge sebanyak 2 kg setiap minggu tidak mempengaruhi tudung akrosom spermatozoa semen beku sapi Bali *polled*. Persentase TAU yang diperoleh pada penelitian ini berkisar $77,10 \pm 3,08 - 79,83 \pm 4,63\%$. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Priyanto *et al.*, (2015) bahwa persentase TAU semen sapi ada pada kisaran 71,92%. Lebih lanjut India Agri Ministry (2014) melaporkan bahwa persentase TAU pada semen beku minimal 65%, sehingga persentase TAU pada penelitian ini masih dalam kisaran normal. Semakin tinggi proporsi spermatozoa dengan TAU, semakin tinggi peluang spermatozoa mampu menembus zona pelusida dan berfusi dengan membran plasma oosit (Celeghini *et al.*, 2007). Bagian selubung akrosom spermatozoa mengandung bahan-bahan akrosomal yaitu enzim-enzim (hyaluronidase, akrosin dan sebagainya) yang berperan dalam menginduksi

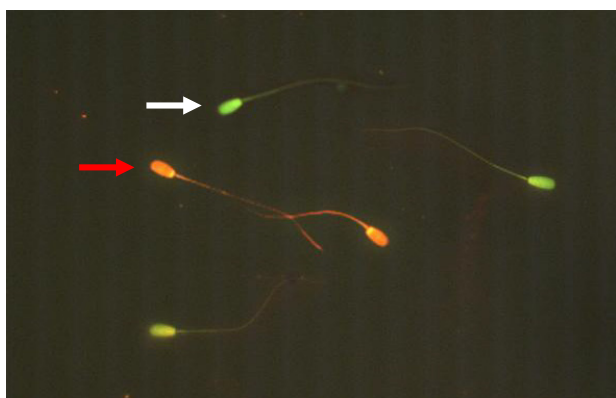


Gambar 4. Tudung akrosom utuh spermatozoa semen beku sapi bali *Polled* (Hitam: TAU yang utuh; Merah: TAU yang rusak). Pembesaran 200x

reaksi akrosom dan interaksi dengan zona pellucida pada saat terjadi fertilisasi (Cahya *et al.*, 2017). Oleh karena itu, tudung akrosom harus tetap utuh untuk melindungi keluarnya enzim-enzim dan materi genetik sebelum dilepaskan di dalam organ reproduksi betina (Ardhani *et al.*, 2020).

Fragmentasi DNA

Fragmentasi DNA spermatozoa menunjukkan integritas kromatin sebagai indikator kematangan kromatin spermatozoa. Kepala spermatozoa yang memiliki integritas kromatin yang baik akan berwarna hijau, sedangkan integritas kromatin yang rusak akan berwarna orange (Gambar 5). Kerusakan kromatin DNA merupakan faktor penyebab terjadinya kegagalan fertilisasi (Prabowo *et al.*, 2016). Persentase fragmentasi DNA semen beku sapi bali *polled* setelah pemberian taoge pada penelitian ini nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan sebelum pemberian taoge. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan nutrisi yang terdapat dalam taoge dapat menurunkan fragmentasi DNA spermatozoa semen beku sapi bali *Polled*. Penurunan fragmentasi DNA diduga disebabkan karena kandungan antioksidan yang terdapat dalam taoge dan mampu memenuhi kebutuhan antioksidan pada spermatozoa sehingga memberikan pertahanan yang efektif terhadap peroksidasi lipid dan stres oksidatif saat proses kriopreservasi. Astrid *et al.*, (2015) mengemukakan bahwa peroksidasi lipid dan stres oksidatif dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA sehingga untuk mencegah hal



Gambar 5. Pengamatan fragmentasi DNA spermatozoa semen beku sapi bali *Polled* (Putih: spermatozoa dengan DNA yang tidak Terfragmentasi; Merah: spermatozoa dengan DNA yang terfragmentasi). Pembesaran 200x

tersebut dibutuhkan antioksidan seperti vitamin E. Khezri *et al.*, (2019) melaporkan bahwa kerusakan DNA pada spermatozoa berdampak pada kegagalan proses embryogenesis dan diduga merupakan salah satu faktor penyebab rendahnya fertilitas. Persentase fragmentasi DNA pada penelitian ini tergolong rendah yaitu berkisar $4,93 \pm 1,97$ - $9,34 \pm 1,34\%$. Bochenek *et al.*, (2001) melaporkan bahwa kerusakan DNA lebih dari 10% menurunkan fertilitas seekor pejantan. Lebih lanjut D'Occhio *et al.*, (2013) menjelaskan bahwa kerusakan DNA kurang dari 15% masih dalam kondisi normal, namun kerusakan DNA 15%-25% dapat menurunkan fertilitas sedangkan diatas 25% pejantan diklasifikasikan infertil.

Kesimpulan

Pemberian taoge meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa semen segar, namun tidak meningkatkan volume dan abnormalitas. Sedangkan pada semen beku meningkatkan viabilitas, dan membran plasma utuh, menurunkan abnormalitas dan fragmentasi DNA, namun motilitas dan tudung akrosom utuh tidak mengalami peningkatan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), dan Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai kegiatan penelitian ini melalui program Riset dan Inovasi untuk Indonesia Maju Gelombang 1 Tahun 2022 dengan nomor kontrak 35/IV/KS/06/2022 dan 1935/UN4.22/PT.01.03/2022 tanggal 30 Juni 2022.

Daftar Pustaka

Adiputra, K.D.D., Maulana. T., Kaiin, E.M., Hasbi, H., and Sonjaya, H. (2022). The semen quality of bali and simmental bulls reared in Technical Implementation Unit of Region Artificial Insemination Center at Pucak, South Sulawesi. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 10 (12): 2562-2570.

- Agarwal, A., *et al.*, (2022). Sperm vitality and necrozoospermia: Diagnosis, management, and results of a Global survey or clinical practice. *The World Journal of Men's Health*. 40(2): 228-242.
- Ahammad, M.U., Nishino, C., Tatemoto, H., Okura, N., Okamoto, S., Kawamoto, Y., Nakada, T. (2013). Acrosome reaction of fowl sperm: Evidence for shedding of the acrosomal cap in intact form to release acrosomal enzyme. *Poultry Science*. 92(3): 798-803.
- Anastasia, Y.I., Isnaini, N. and Wahjuningsih, S. (2015). Pengaruh level filtrat kacang hijau dalam pengencer susu skim terhadap kualitas semen cair pejantan sapi Madura pada penyimpanan suhu ruang. *Jurnal Ternak Tropika*. 16 (2): 55-63.
- Ardhani, F., Mufidah, H., Samsuriati, R. and Putra, H.P. (2020). The storage duration effects of bali bull's frozen semen at artificial insemination station on plasma membrane integrity, acrosome integrity, and spermatozoa DNA. *Jurnal Ilmu Peternakan Terapan*. 3 (2): 58-66.
- Arifiantini, I., Yusuf, T.L. and Graha, N. (2005). Longivitas and recovery rate of freeze fresian Holstein bull semen on different extender. *Buletin Peternakan*. 29 (2): 53-61.
- Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Riyadhi, M. (2010). Occurrence of sperm abnormality of beef cattle at several artificial insemination centers in Indonesia. *Animal Production*. 12(1): 44-49.
- Arifiantini, I. (2012). *Teknik Koleksi Dan Evaluasi Semen Pada Hewan*. IPB Press, Bogor.
- Arsiwan, A., Saili, T., Ba'a, L.A., and Rahadi S. (2014). Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing peranakan etawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 1(1): 79-87.
- Astrid, G.S., Wantouw, B. and Queljoe, E. (2015). Perbedaan antara efek pemberian vitamin c dan vitamin e terhadap kualitas spermatozoa tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan setelah diberi paparan asap rokok. *Jurnal e-Biomedik*. 3 (1): 65-71.
- Baco, S., Zulkharnaim., Malaka, R. and Moekti, G.R. (2020). Polled Bali cattle and potentials for the development of breeding industry in Indonesia. *Hasanuddin Journal of Animal Science*. 2 (1): 23-33.
- Badan Standardisasi Nasional. (2017). *Semen Beku Sapi Bagian 1*. SNI 4869- 1:2017. BSN, Jakarta.
- Basir, A.A., Hassan, M.S., Buranda, T. and Ferial, E.W. (2013). Pengaruh pemberian nutrisi *Phaseolus radiatus* L. terhadap tingkat kepadatan spermatozoa *Mus musculus* L. *Biogenesis*. 1 (1): 70-73.
- Bochenek, M., Smorag, Z. and Pilch, J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*. 56 (4): 557-67.
- Cahya, R.I., Ondho, Y.S. and Setiatin, E.T. (2017). Persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa Kambing Peranakan Etawah dalam pengencer yang berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Politeknik Pembangunan Pertanian*, 406-416.
- Cahyadi, T.R.T., Christiyanto, M. and Setiatin, E.T. (2016). Sperm live-cells and abnormality of etawah grade (PE) bucks supplemented with binahong leaves (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Animal Agriculture Journal*. 5 (3): 23-32.
- Celeghini, E.C., Nascimento, J., Raphael, C.F., Andrade, A.F. and Arruda, R.P. (2010). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62 (3): 536-543.
- D'Occhio, J., Hengstberger, K.J., Tutt, D., Holroyd, R.G., Fordyce, G., Boe-Hansen, G.B. and Johnston, S.D. (2013). Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. *Theriogenology*. 79 (6): 946-952.

- Diartha, I.W.W, Sudatri, N.W. and Setyawati, I. (2016). The effect of bean sprout extracts and honey to sperm quality of male mice (*Mus musculus L.*). *Jurnal Simbiosis*. 4 (1): 1-5.
- Hasbi, H., Dagong, M.I.A., Zulkharnain Z., Baba, S., Sonjaya, H., Baco, S., Gustina, S., Maulana, T., Gunawan, M., Agung, P.P., Herlina, N., Yanthi, N.D., Kaiin, E.M., Said, S. (2023). Comparoson of Fresh and Vryopreserved Semen Quality of Polled and Horned Bali Bulls. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 13 (1): 33-41.
- Fazrien, W.A., Herwijanti, E. and Isnaini, N. (2020). Effect of individual variation on fresh and frozen bali bulls semen. *Sains Peternakan*. 18 (1): 60-65.
- Gebreyesus, G., Lund, M.S., Kupisiewicz, K., and Su, G. (2021). Genetic parameters of semen quality traits and genetic correlations with service sire nonreturn rate in Nordic Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 104: 10010-10019.
- Gustina, S., Hasbi, H., Sonjaya, H., Baco, S., Toleng, A.L., Mutmainna, M. and Farida, S. (2022). Motility and viability of spermatozoa of polled and horned bali bulls at each stage of the freezing process. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 9 (1): 48-54.
- Handayani, E., Supriatna, I., Tumbelaka, L.I. and Kaiin, E.M. (2021). Comparative analyzis of quality SNI certified and non SNI certified frozen semen. *Jurnal Veteriner*. 22 (2):207-215.
- Hasbi, H., Prahesti, K.I., Sonjaya, H., Baco, S., Wildayanti, W. and Gustina, S. (2021). Characteristics of libido and testosterone concentrations of Bali polled and horned bulls. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 788(012141): 1-6.
- Hasbi, H., Sonjaya, H., Baco, S., Amalia, R. and Gustina, S. (2021). Characteristics of libido and testosterone concentration of polled and horned Bali bulls after GnRH injection. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 26 (3): 108-114.
- Hidayanti, N., Sulistiarini, R., Ramadhan, A.M. dan Rijai, L. (2017). Pengaruh pemberian ekstrak taoge (*Vigna radiata L.*) pada mencit jantan (*Mus musculus*) terhadap jumlah anak yang dilahirkan. *Proceeding of the 5th Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 181-187.
- Ichwandi. (2004). *Performans motilitas, tudung akrosom utuh dan velositas spermatozoa tanpa dan dengan metode 'swim up' pasca 'thawing' pada semen beku sapi potong*. Disertasi, Universitas Diponegoro, Semarang.
- India Agriculture Ministry. (2014). *Compendium of Minimum Standards of Protocol and Standard Operating Procedures for Bovine Breeding*. Department of Animal Husbandry, Dairying and Fisheries, India.
- Indriastuti, R., Ulum, M.F., Arifiantini, R.I. and Purwantara, B. (2020). Individual variation in fresh and frozen semen of Bali bull (*Bos sondaicus*). *Veterinary World*. 13 (5): 840-846.
- Ismaya. (2014). *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau (Bioteknologi of Artificial Insemination on Cattle and Bufallo)*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Johnson, W.H. (1997). The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 13 (2): 255-270.
- Khairi, F., Muktiani, A., dan Ondho, Y.S. (2014). Pengaruh suplementasi vitamin E, mineral selenium dan zink terhadap konsumsi nutrient, Produksi dan kualitas semen sapi Simental. *Agripet*. 14(1): 6-16.
- Khezri, A., Narud, B., Stenseth, E.B., Johannisson, A., Myromslien, F.D., Gaustad, A.H., Wilson, R.C., Lyle, R., Morrell, J.M., Kommisrud, E. and Ahmad, R. (2019). DNA methylation patterns vary in boar sperm cells with different levels of DNA fragmentation. *BMC Genomics*. 20 (1): 1-15.

- Komariah, Arifiantini, R.I., Aun, M. and Sukmawati, E. (2020). The quality of fresh semen dan frozen semen production madura bulls in different seasons. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 8 (1): 5-21.
- Lemma, A. and Shemsu, T. (2015). Effect of age and breed on semen quality and breeding soundness evaluation of pre-service young bulls. *Journal of Reproduction and Infertility*. 6 (2): 35-40.
- Len, J.S., Koh, W.S.D. and Tan, S.X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*. 39: 1-35.
- Manohara, G.D.I., Normasari, R. and Febianti, Z. (2015). The effect of mung bean (*Vigna radiata* L) sprout extract on tunica intima-media thickness of aorta abdominalis of male wistar rats induced by physical stress. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 3 (3): 380-385.
- Martianingsih, N., Sudrajat, H.W. dan Darlian, L. (2016). Analisis kandungan protein kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) terhadap variasi waktu perkecambahan. *Jurnal Alumni Pendidikan Biologi*. 1 (2): 38-42.
- Maruliyanda, C., Hayat, A. and Pidada, I.B.R. (2013). Pengaruh ekstrak etanolik kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus*) terhadap jumlah dan morfologi spermatozoa mencit yang terpapar 2-methoxyethanol. *Jurnal Ilmiah Biologi FST*. 1 (1): 1-10.
- Moretti, E., Signorini, C., Moto, D., Corsaro, R., Collodel, G. (2022). The relevance of sperm morphology in male infertility. *Frontiers in Reproductive Health*. 4: 945351.
- Murphy, E.M., Kelly, A.K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., and Fair, S. (2018). Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science*. 96: 2408-2418.
- Nabilla, A., Arifiantini, R.I. and Purwantara, B. (2018). Fresh semen quality of Bali bull in productive and non-productive age and determination of cryoprotectant concentration in Tris Egg Yolk extender. *Jurnal Veteriner*. 19 (2): 242-250.
- Novita, R. (2020). The influence of long thawing time on the quality of simmental frozen semen microscopically. *Tropical Animal Science*. 2 (2): 66-73.
- Nugroho, Y., Susilawati, T. and Wahjuningsih, S. (2015). Kualitas semen sapi Limousin selama pendinginan menggunakan pengencer CEP-2 dengan penambahan berbagai konsentrasi kuning telur dan sari buah jambu biji (*Psidium guajava*). *Jurnal Ternak Tropika*. 15 (1): 31-42.
- Nurcholis., Arifiantini, R.I. and Yamin, M. (2015). Effect of feed bean sprout waste and supplementation omega-3 on production spermatozoa garut rams. *Agricola*. 5 (2): 133-142.
- Ostermeier, G.C., Sargean, G.A., Yandell, B.S., Evenson, D.P. and Parrish, J.J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*. 22 (4): 595-603.
- Purwantara, B., Noor, R.R., Anderson, G., and Rodrigez-Martinez, H. (2012). Banteng and Bali cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (Suppl. 1): 2-6.
- Prabowo, T.A., Arifiantini, R.I., Sajuthi, D. and Saefullah, U. (2016). Development method of livestock sperm DNA damage identification. *Jurnal Sain Veteriner*. 34 (2): 166-171.
- Priyanto, L., Arifiantini, R.I. and Yusuf, T.L. (2015). Detection of sperm DNA damage in fresh and frozen semen using toluidine blue staining. *Jurnal Veteriner*. 16 (1): 48-55.
- Rangkuti, N.J., Suteky, T. and Putranto, H.D. (2021). Pengaruh waktu pre freezing terhadap kualitas semen beku sapi Bali di UPTD IB Bengkulu. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan dan Pendidikan Vokasi Pertanian*, 165-176.

- Rosandi, F.N. and Sjafarjanto, A. (2015). Pengaruh pemberian pakan tambahan tepung bekicot (*Achatina fulica*) terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa pada mencit (*Mus musculus*). *Vitek*. 5: 1-7.
- Sades, A.M., Isnaini, N. and Wahjuningsih, S. (2016). Pengaruh suplementasi filtrat kecambah kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) terhadap kualitas semen sapi simmental dalam pengencer skim milk pada suhu dingin. *Jurnal Ternak Tropika*. 17 (1): 1-10.
- Singh, A.K., Rajak, S.K., Kumar, P., Kerketta, S., and Yogi, R.K. (2018). Nutrition and bull fertility: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6(6), 635–643.
- Soderquist, L., Janson, L., Larsson, K. and Einarsson, S. (1991). Sperm morphology and fertility in Artificial Insemination bulls. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*. 38 (7): 534-543.
- Sukmawati, E., Arifiantini, R.I. and Purwantara, B. (2014). Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 19 (3): 168-175.
- Syarifuddin, N.A. (2021). *Daun Kelor Meningkatkan Libido dan Kualitas Sperma Sapi Bali*. Bintang Pustaka Madani, Yogyakarta.
- Thundathil, J., Palasz, A.T., Mapletoft, R.J. and Barth, A.D. (1999). An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 57 (1): 35–50.
- Uswa, H.M., Sonjaya, H., Gustina, S. and Hasbi, H. (2022). The concentration of hydrogen peroxide, percentage of motility, viability, plasma membrane integrity, and abnormality of frozen semen of horned and polled Bali bulls. *International Journal of Science: Basic and Applied Research*. 64 (1): 104-115.
- Utomo, W.T., Suarsana, I.N. and Suartini, I.G.A.A. (2017). Characteristics of Bali cattle plasma proteins. *Jurnal Veteriner*. 18 (2):232–238.
- Wijayanti, P.M., Kirana, A.D. and Indriaswati, T. (2013). Biskuit taug sebagai “healthy super food” berbasis sumber daya lokal. *Prosiding Seminar Nasional Menuju Masyarakat Madani dan Lestari*, 555-572.
- Winarsi H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Yahaq, M.A., Ondho, Y.S. and Sutiyono. (2019). Effect of vitamin C addition in the extender on post thawing quality sperm of frozen limousin bull semen. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 14 (4): 380-386.
- Yuliyantika, Y., Iswari, R.S. and Marianti, A. (2019). Daya proteksi ekstrak taug kacang hijau terhadap kualitas spermatozoa dan kadar enzim superoksida dismutase mencit yang terpapar transfluthrin. *Life Science*. 8 (2): 138-149.