

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**PENGEMBANGAN MEDIA SPERMATOZOA SAPI SIMENTAL
DALAM KONDISI BEKU DENGAN MEMANFAATKAN EKSTRAK
TEH HIJAU SEBAGAI ANTIOKSIDAN UPAYA MEMENUHI
KETAHANAN PANGAN NASIONAL**

Tahun ke-1 dari rencana 2 Tahun

**Dr. TRILAS SARDJITO, MSi, Drh /0030055502
OKKY SETYO WIDOBO, MSi. Drh / 0009029101
Dr. ROCHMAH KURNIASANTI, M Kes. Drh /0019077004**

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**



**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



kic
kk
LP 09/19
Sar
P

**PENGEMBANGAN MEDIA SPERMATOOA SAPI SIMENTAL
DALAM KONDISI BEKU DENGAN MEMANFAATKAN EKSTRAK
TEH HIJAU SEBAGAI ANTIOKSIDAN UPAYA MEMENUHI
KETAHANAN PANGAN NASIONAL**

Tahun ke-1 dari rencana 2 Tahun

**Dr. TRILAS SARDJITO, MSi, Drh /0030055502
OKKY SETYO WIDODO, MSi. Drh / 0009029101
Dr. ROCHMAH KURNIASANTI, M Kes. Drh /0019077004**

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENGEMBANGAN MEDIA SPERMATOZOA SAPI
SIMENTAL DALAM KONDISI BEKU DENGAN
MEMANFAATKAN EKSTRAK TEH HIJAU SEBAGAI
ANTIOKSIDAN UPAYA MEMENUHI KETAHANAN
PANGAN NASIONAL

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr TRILAS SARDJITO, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0030055502
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Pendidikan Profesi Dokter Hewan
Nomor HP : 08123210399
Alamat surel (e-mail) : tril_fkh@unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : drh. OKY SETYO WIDODO S.K.H, M.Si
NIDN : 0009029101
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr ROCHMAH KURNIJASANTI M.Si
NIDN : 0019077004
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 242,955,000



(Prof. Dr. Puji Srianto, M.Kes.,drh.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018
Ketua,

Trilas

(Dr TRILAS SARDJITO, M.Si)
NIP/NIK 195505301987011001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair

(Prof. H. Hery Purnobasuki, Ds. M.Si, PhD)
NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui manfaat ekstrak teh hijau yang ditambahkan dalam diluter susu kuning telur terhadap kualitas spermatozoa beku sapi Simental dan mengetahui keberhasilan kawin suntik pada sapi. Rencana kegiatan penelitian ini terdiri dari 2 tahun. Tahun pertama (I) yaitu penambahan ekstrak teh hijau berbagai dosis dalam diluter susu kuning telur sampai proses pembekuan. Teh hijau pada penelitian ini ditambahkan setelah proses pencampuran semen dengan pengencer susu kuning telur. Konsentrasi yang ditambahkan adalah 0,5 mg /100 ml, 1 mg/100 ml dan 1,5 mg/100 ml. Tahun kedua (II) yaitu proses kawin suntik pada sapi Simental dengan semen beku yang telah diproses tersebut sampai terjadi kebuntingan. Untuk kegiatan tahun I dilakukan posthawing dan dilakukan evaluasi meliputi motilitas, viabilitas, membrane plasma utuh, nekrosis dan apoptosis. Untuk kegiatan tahun kedua dilakukan kawin suntik pada sapi Simental dengan terlebih dahulu disinkronisasi dan disuperovulasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan F Test.

Kesimpulan yang didapat bahwa penambahan ekstrak teh hijau dengan kadar 1 mg/ml bahan pengencer susu kuning telur menunjukkan persentase yang paling baik dengan parameter motilitas, viabilitas dan membrane plasma utuh meningkat, nekrosis dan apoptosis spermatozoa persentasenya menurun.



PRAKATA

Berkat rahmat Allah SWT, kegiatan penelitian ini dapat berjalan dengan lancar dan 100% selesai.

Pada kesempatan ini tim peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Atas selesainya laporan penelitian ini

Surabaya, 10 Nopember 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Pengesahan	i
Ringkasan	ii
Prakata	iii
Daftar Isi	iv
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Daftar Lampiran	vii
BAB 1. Pendahuluan	1
BAB 2. Tinjauan Pustaka	5
BAB 3. Tujuan Dan Manfaat Penelitian	10
BAB 4. Metode Penelitian	11
BAB 5. Hasil dan Luaran Yang Dicapai	18
BAB 6. Rencana Tahapan Berikutnya	27
BAB 7. Kesimpulan Dan Saran	28
Daftar Pustaka	29
Lampiran 1. Artikel ilmiah pada seminar international	32
Lampiran 2. Artikel ilmiah pada Philippine J. Vet. Med.	45
Lampiran 3. Draft HKI	57

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi Simental.	18
Tabel 2. Rataan motilitas, viabilitas, membrane plasma utuh, nekrosis dan apoptosis spermatozoa sapi Simental post thawing	19

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Semen beku dalam container	20
Gambar 2. Straw semen sapi Simental	21
Gambar 3. Spermatozoa yang mengalami hidup dan mati	22
Gambar 4. Spermatozoa yang mmbrannya utuh dan tidak	22
Gambar 5. Spermatozoa yang mengalami apoptosis dan tidak	23

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Artikel ilmiah pada seminar internasional	32
Lampiran 2. Artikel Ilmiah pada Philippine Jurnal Veterinary Medicine	45
Lampiran 3. Draft HKI	57

BAB. I. PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang

Penyediaan pangan-termasuk pangan asal hewan-akan terus menjadi tantangan bagi Negara manapun di dunia, karena kecepatan perkembangan penduduk dan tingkat pendapatan telah menjadi suatu keniscayaan. Untuk memenuhi kebutuhan pangan sumber karbohidrat, sudah menjadi isu penting bagi negara-negara dengan sumber daya yang terbatas, sementara kebutuhan pangan dasar terus meningkat. Ketahanan pangan nasional di Indonesia memiliki beberapa karakteristik, termasuk keharusan berorientasi kepada kepentingan sosial dan ekonomi, serta kebutuhan gizi masyarakat, menjamin ketersediaan, dan aksesibilitas agar hidup sehat dan produktif. Pengertian ketahanan pangan ini adalah suatu kondisi terpenuhinya pangan bagi masyarakat secara cukup, baik dalam jumlah maupun mutu yang, aman, merata, dan terjangkau.

Salah satu upaya untuk memenuhi ketahanan pangan tersebut, adalah meningkatkan reproduktivitas ternak yaitu dengan adanya keberhasilan inseminasi buatan atau kawin suntik yang sampai saat ini belum tuntas. Potensi permintaan daging di Indonesia sangat besar. Dengan jumlah penduduk Indonesia saat ini lebih dari 200 juta dengan tingkat pertumbuhan sekitar 1,5% pertahun dan elastisitas permintaan daging yang tinggi, maka peningkatan pendapatan dan pertambahan penduduk secara nyata meningkatkan jumlah permintaan akan daging setiap tahunnya. Oleh karena itu, pemerintah terus berupaya mendorong perkembangan industry peternakan di Indonesia.

Keberhasilan inseminasi buatan atau kawin suntik pada sapi dipengaruhi oleh faktor kualitas semen beku. Permasalahan semen beku adalah rendahnya kualitas semen setelah pengenceran kembali atau yang disebut dengan thawing, yang ditandai dengan terjadinya perubahan fungsional spermatozoa ultra struktur yang berakibat kegagalan fertilisasi, kerusakan membrane plasma dan tudung akrosom yang menyebabkan terjadinya penurunan

motilitas, daya hidup dan kegagalan fertilisasi. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga dapat karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan bersifat racun selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya kristal ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya osmotic swelling (Kassai, 1996). Kerusakan selama pembekuan bisa terjadi pada membrane plasma maupun pada inti spermatozoa (apoptosis). Membran plasma spermatozoa tersusun atas lipid, protein dan karbohidrat. Lipid membrane plasma spermatozoa memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi sehingga menyebabkan spermatozoa rentan terhadap ROS (Reactive Oxygen Species) (Sanocka and Kurpisz, 2004). Peroksidasi pada spermatozoa diikuti oleh perubahan struktur membrane plasma spermatozoa sehingga mengubah kestabilan dan fungsi membrane serta penurunan fluiditas membrane spermatozoa. Rusaknya membrane plasma mitokondria spermatozoa menyebabkan metabolisme spermatozoa terganggu dan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Inisiasi apoptosis bisa terjadi akibat signal intrinsik yang dihasilkan oleh sel yang mengalami stress. Jalur intrinsic atau jalur mitokondria dimulai dengan permeabilisasi selaput luar mitokondria. Permeabilisasi ini bergantung pada *permeability transition pore* (PT pore). Terbukanya PT pore akan berakibat masuknya air kedalam matrik mitokondria sehingga ruang intermembran membengkak dan membrane luar robek. Robeknya selaput luar mitokondria berakibat keluarnya protein-protein proapoptogenik (Crompton *et al*, 1998). Beberapa protein yang dilepas antara lain *cytokrom c*, *apoptosis inducing factor* (AIF) dan endonuklease G (Liet *al*, 2001). Cytochrome c bersama dengan Apaf-1 serta procaspase 9 membentuk ikatan kompleks yang disebut apoptosome yang nantinya akan mengaktifkan caspase efektor hingga terjadinya apoptosis (Zou *et al*, 1999). AIF dan endonuklease G berkontribusi akan terjadinya fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin yang merupakan tanda khas terjadinya apoptosis (Loo *et al*, 2001)

Pelepasan *cytochrom c* kesitosol dari mitokondria akan membentuk suatu kompleks multimerik dan *cytochrom c*, *apaf 1* dan *procaspase 9* yang disebut apoptosom. Di dalam apoptosom segera *procaspase 9* akan diaktifkan menjadi caspase 9 suatu enzyme yang kemudian akan mengaktifkan *procaspase 3* menjadi caspase 3 suatu caspase eksekutor (Peterson *et al*, 2010)

Oleh karena itu perlu adanya bahan yang dapat meredam Reactive Oxygen Species yang ditambahkan dalam media pengencer untuk pembekuan semen. Salah satunya yaitu teh hijau. Teh hijau dapat bertindak sebagai antioksidan karena mengandung bahan aktif yaitu polyphenolic, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechingallate dan apigallocatechin-3 gallate (Sulistyo dkk, 2003). Ekstrak teh hijau juga dilaporkan mempunyai keuntungan terhadap kualitas spermatozoa kucing yang disimpan pada suhu dingin dengan waktu yang panjang dan juga mencegah oksidasi pada spermatozoa babi pada proses pembekuan (Mahdieh *et al*, 2016). Berdasarkan uraian diatas maka peneliti ingin meneliti penambahan ekstrak teh hijau dalam media semen sapi Simental post thawing.

1.2.Rumusan Permasalahan

1. Apakah penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa sapi Simental post thawing ?
2. Apakah penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa sapi Simental post thawing ?
3. Apakah penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase membrane plasma utuh spermatozoa sapi Simental post thawing ?
4. Apakah penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat menurunkan persentase kejadian nekrosis spermatozoa sapi Simental post thawing ?

5. Apakah penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat menurunkan persentase apoptosis spermatozoa sapi Simental post thawing ?
6. Apakah semen beku yang telah diproses dapat meningkatkan angka kebuntingan pada proses kawin suntik ? (tahun II).

BAB. 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Teh Hijau

Teh hijau atau *Camellia sinensis* merupakan tanaman perdu yang bercabang-cabang . Teh hijau ini umumnya ditanam diperkebunan dan tumbuh diketinggian 200-2300 m dari permukaan laut. Umumnya dipanen secara manual . daunnya berwarna hijau gelap berbentuk oval dengan pinggiran bergerigi dan bunganya berwarna putih beraroma. Teh hijau diproduksi dari perebusan daun teh segar pada temperatur tinggi sehingga enzim pengoksidasinya tidak aktif dan kandungan polifenolnya tetap ada. Komponen teh terdiri dari polifenol termasuk katekin, kafein, asam amino, vitamin, polisakarida dan florin. Katekin yang terkandung pada setiap 100 gram daun teh adalah sebesar 16-30%. (Foster, 2000). Katekin juga disebut asam katekoat dengan rumus kimia $C^{15}H^{14}O^6$. Teh hijau mengandung senyawa antioksidan yang disebut Epigallocatechin gallate (EGCG) (Sulistyo dkk, 2003 dalam Agustina, 2015). EGCG merupakan golongan katekin yang paling dominan pada teh hijau dan memiliki aktifitas antioksidatif yang sangat kuat. Stabilitas katekin dipengaruhi oleh pH dan suhu. Apabila pH dan suhu semakin tinggi maka semakin menurun kandungan katekinnya (Chen *et al*, 2001)

Hasil dari pemrosesan daun teh hijau mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat (Raza dan John, 2008). Kemampuan senyawa katekin sebagai antioksidan telah banyak dibuktikan dengan kekuatan 100 kali lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dari pada vitamin E (Syah, 2006).

2.2. Spermatozoa dan plasma semen

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma. Morfologi spermatozoa terdiri dari tiga bagian yaitu bagian kepala, leher

dan ekor (Garner and Hafez, 2000). Inti ada di dalam kepala dan mempunyai ukuran kira-kira sepertiga panjang kepala, mengandung bahan genetik yang dibutuhkan pada saat membuahi sel telur. Inti spermatozoa mengandung kromosom yaitu separuh dari jumlah kromosom inti yang diploid pada sel somatik. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria di dalamnya. Bagian ekor dibagi ke dalam mid-piece, tail dan end piece. Mid piece merupakan bagian tebal dari ekor dan terletak disebelah mitochondrial sheath yang terbentuk dari mitokondria spermatid. Mitochondrial sheath mengandung enzim yang dapat mengubah fruktosa dan substrat energi lainnya menjadi senyawa kompleks yang dapat digunakan oleh spermatozoa.

Bagian terbesar semen adalah plasma seminalis yaitu sebesar dua pertiga bagian berupa sekresi dari kelenjar asesoris. Plasma semen mempunyai pH sebesar sekitar 7.0 dan tekanan osmotik sama dengan tekanan darah. Fungsi plasma semen adalah sebagai pembawa spermatozoa dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat berjalan dengan baik karena plasma semen mengandung bahan-bahan penyanggah dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Plasma semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik mengatur fungsi spermatozoa. Plasma semen mengandung asam askorbat, asam amino, peptida, protein, lipid, asam lemak, beberapa enzim, antimikroba yaitu Immunoglobulin A dan beberapa hormon (Susilowati dan Hernawati, 2013). Plasma semen mengandung berbagai macam protein yang berasal dari kelenjar asesoris dan sebagian besar turut berkontribusi dalam fertilitas maupun fungsi spermatozoa protein tersebut dapat bertindak sebagai stimulator maupun inhibitor berbagai reaksi biokimia dalam spermatozoa (Muino-Blanco *et al*, 2008). Plasma semen juga mengandung bahan-bahan yang dapat menghambat pengikatan oksidatif dan beberapa bahan yang mempunyai kemampuan sebagai antioksidan untuk melindungi kerusakan spermatozoa

yaitu vitamin C, zink, transferin, laktoferin, albumin yang sangat bervariasi antara satu individu dengan individu lain (Subratha, 1998).

2.3. Bahan pengencer semen atau air mani

Bahan pengencer yang dipakai untuk penyimpanan harus sedemikian rupa sehingga kualitas yang baik dari semen yang disimpan dapat dipertahankan. Adapun tujuan pengenceran adalah untuk meningkatkan volume semen yang diperoleh (Hardijanto, dkk, 2010). Pengenceran semen dapat dilakukan dengan penambahan bahan-bahan tertentu yang mampu memberikan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa dan dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa diluar tubuh (Salisbury dan Van Demark, 1985). Syarat bahan pengencer yang baik adalah sebagai berikut : mempunyai tekanan osmose isotonis dengan darah dan dapat mempertahankan tekanan isotonis selama penyimpanan, memberikan imbalan unsur mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan spermatozoa, menyebabkan bahan makanan spermatozoa untuk proses metabolisme aerob dan an aerob, memiliki lipoprotein atau lecitin untuk melindungi spermatozoa untuk kejutan dingin, menyediakan penyanggah terhadap produk akhir metabolisme yang bersifat racun terhadap spermatozoa, merupakan bahan reduksi untuk melindungi enzim seluler yang mengandung sulfhydryl, bebas dari substansi produk kuman-kuman atau organisme yang berbahaya bagi spermatozoa, alat reproduksi betina, fertilisasi, implantasi dan pengembangan ovum yang difertilisasi (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Keisotonisan larutan pengencer berguna untuk menjaga keseimbangan cairan yang ada di dalam sel dan diluar sel karena bila larutan pengencer bersifat hipotonik maka cairan yang ada di luar sel akan masuk ke dalam sel dan apabila larutan pengencer bersifat hipertonik cairan yang ada di dalam sel akan terserap ke luar. Keadaan diatas dapat terjadi

karena dinding sel bersifat semipermeabel. Larutan pengencer yang bersifat hipotonik atau hipertonic sangat berbahaya bagi kehidupan sel (Bearden & Fuquay, 1980).

2.4. Pembekuan semen

Pembekuan adalah teknik penyimpanan semen dalam keadaan beku pada temperatur rendah dan dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel didalam sel, fungsi fisiologis, biologi dan morfologi pengaruh pembekuan pada fungsi spermatozoa dan kesuburan telah dipelajari secara luas pada berbagai spesies hewan terutama pada sapi. Secara ultrastruktur, membran plasma dan akrosom luar dari spermatozoa akan terganggu selama proses pembekuan. Kapasitas dini dan reaksi akrosom dan fungsi mitokondria akan berubah sehingga motilitas terganggu. (Layek *et al*; 2016).

2.5. Thawing

Thawing dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menyebabkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku (Salim dkk, 2012)

Proses thawing dapat mempengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup membran spermatozoa. Metode thawing semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan karena cara thawing yang tidak tepat menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga kualitas akan menurun. Suhu dan lama thawing mempunyai pengaruh besar terhadap keadaan spermatozoa khususnya keutuhan spermatozoa (Zelpina, 2012). Jika terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak

menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa (Salim dkk, 2012)

Penurunan persentase hidup spermatozoa post thawing biasa terjadi pada proses pembekuan dan post thawing karena terjadi perbedaan temperatur. Pada saat pencairan kembali permeabilitas membran plasma spermatozoa akan berubah dan mengakibatkan kematian sel (Zelpina dkk, 2012).

2.6. Fertilisasi

Keberhasilan fungsi spermatozoa dalam fertilisasi dipengaruhi oleh kualitasnya. Spermatozoa yang normal mempunyai kualitas baik sehingga mampu melakukan kapasitasi, reaksi akrosom dan menerobos dinding zona pelusida sel telur pada saat fertilisasi. Fertilisasi terjadi karena adanya pertemuan antara spermatozoa dan oosit. Spermatozoa dalam menjalankan fungsinya untuk fertilisasi dilengkapi dengan kemampuan untuk bergerak. Kemampuan ini datangnya tidak begitu saja melainkan melalui banyak proses, ketika spermatozoa keluar dari tubulus seminiferus menuju epididimis, ditempat inilah spermatozoa mulai bergerak (Hayati, 2011).

BAB.3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui manfaat ekstrak teh hijau yang ditambahkan dalam diluter susu kuning telur terhadap kualitas spermatozoa beku sapi Simental dan mengetahui keberhasilan kawin suntik pada sapi tersebut.

Tujuan umum penelitian ini adalah peningkatan kualitas semen cair maupun semen beku sapi Simental sehingga diperoleh angka fertilisasi yang tinggi pada program kawin suntik yang nantinya populasi ternak sapi dapat meningkat sehingga kebutuhan pangan terpenuhi.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah kualitas dari semen beku sapi lebih baik sehingga pada program kawin suntik keberhasilannya meningkat dan akhirnya populasi ternak sapi juga meningkat kebutuhan protein hewani terpenuhi.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB.4.METODE PENELITIAN

4.1.Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung 2 tahun. Tahun I yaitu penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer semen sapi sampai tahap pembekuan, selanjutnya tahun II dilakukan kawin suntik pada sapi dengan menggunakan semen beku yang telah diproduksi. Penampungan semen, pemeriksaan kualitas spermatozoa dan pembuatan semen beku dilakukan di Teaching Farm Fakultas Kedokteran Hewan.

4.2.Variabel penelitian :

1. Variabel bebas : macam bahan pengencer dan konsentrasi ekstrak teh hijau
2. Variabel tergantung : motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, keutuhan membran plasma spermatozoa, nekrosis dan apoptosis spermatozoa
3. Variabel kendali : umur sapi, pakan dan pemeliharaan

4.3. Definisi operasional penelitian :

1. Motilitas spermatozoa : spermatozoa yang bergerak aktif ke depan dalam satu lapang pandang
2. Viabilitas spermatozoa : spermatozoa yang hidup bagian kepala spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin berwarna jernih.
3. Keutuhan membran spermatozoa : persentase jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh yang ditandai dengan adanya pembengkakan pada kepala spermatozoa dan adanya ekor yang melingkar yang diuji dengan teknik Hypoosmotik Swelling Test

4. Nekrosis : persentase kematian spermatozoa yang ditandai dengan inti mengalami picnotis, kariorexis, dan kariolysis yang diketahui dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) yang ditemukan pada lima lapang pandang yang berbeda pada pembesaran 400 kali per 100 spermatozoa
5. Apoptosis : persentase kerusakan /fragmentasi DNA spermatozoa yang diuji dengan Tunnel Assay yang terlihat warna coklat kehitaman pada inti spermatozoa yang diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali
6. Fertilisasi : bersatunya spermatozoa dan sel telur.

4.4. Tahapan Penelitian

1. Penampungan Semen

Semen ditampung dari sapi pejantan Simental dengan menggunakan vagina buatan yang dilengkapi dengan tabung gelas penampung berskala. Vagina buatan disiapkan dengan memasang kedua selubung dan alat penampung yang telah disterilkan, sedangkan ruangan antara selubung luar dan dalam diisi dengan air hangat yang bersuhu 45° C dengan tujuan memberi suhu terhadap selubung dalam sebesar 42-43°C dan sepertiga bagian depan selubung dalam vagina buatan diolesi vaselin. Setelah vagina buatan selesai dipersiapkan, pejantan diberi rangsangan dengan betina pemancing kemudian dilakukan penampungan semen. Segera setelah penampungan, semen dibawa ke laboratorium dan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi dan resistensi test.

2. Pengenceran Semen

Semen setelah ditampung diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dibagi menjadi 3 kelompok. Jumlah bahan pengencer yang akan ditambahkan ke dalam masing – masing semen dihitung dengan rumus :

$$\text{Vol pengencer} = \text{vol semen} \times \text{konsentrasi spermatozoa} \times \text{motilitas}$$

Konsentrasi spermatozoa yang diinginkan/ml

3. Penambahan teh hijau

Teh hijau pada penelitian ini ditambahkan setelah proses pencampuran semen dengan pengencer susu kuning telur. Konsentrasi yang ditambahkan adalah 0,5 mg/ 100 ml, 1 mg/ 100 ml dan 1,5 mg/ 100 ml bahan pengencer.

4. Gleserolisasi dan Ekuilibrasi

Penambahan gliserol ke dalam pengencer dan semen berfungsi untuk mencegah terjadinya kristal-kristal es dan menghindari tertimbunnya elektrolit intraseluler di dalam spermatozoa. Gliserol ditambahkan ke dalam bagian kedua dari bahan pengencer (setengah volume). Setengah bagian kedua dari bahan pengencer yang mengandung gliserol ditambahkan pada bagian pertama yang mengandung spermatozoa dalam 4 bagian yang sama dengan beda waktu 15 menit setiap penambahan atau secara tetes demi tetes sehingga selesai dalam waktu 1 jam. Setiap penambahan harus disertai pengadukan perlahan-lahan. Suhu harus dipertahankan 5°C . selama proses pencampuran

Waktu ekuilibrasi merupakan waktu memperkenalkan spermatozoa untuk mengadakan keseimbangan dengan pengencer yang telah ditambah dengan gliserol. Ekuilibrasi semen sapi dilakukan selama 2 jam dengan suhu 5°C. (Susilowati dkk, 2010).

5. Filling dan Sealing Straw

Filling adalah proses memasukkan semen yang telah dicampur dengan pengencer kedalam *straw*. *Straw* yang digunakan yaitu mini *straw* berukuran 0,25 ml. Semen yang dimasukkan ke dalam *straw* minimal mengandung 50 juta spermatozoa.

6. Pre Freezing dan Freezing

Pre freezing dilakukan dengan cara *straw* yang berisi semen disusun pada rak *straw* dan ditempatkan sekitar 1-2 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 9 menit. Freezing dilakukan dengan cara merendam atau menenggelamkan *straw* dalam nitrogen cair pada suhu -196°C (Puspitawangi, 2013)

7. Thawing

Thawing dilakukan dengan cara merendam *straw* yang berisi semen kedalam air hangat suhu 37°C selama 30 detk atau air yang bersuhu $25-30^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit (Yulianto dan Cahyo, 2014). Kemudian ketiga perlakuan tersebut diperiksa motilitas, viabilitas, keutuhan membran plasma, nekrosis dan fragmentasi DNA spermatozoa (apoptosis).

Metode pemeriksaan :

1. Motilitas spermatozoa

Sebanyak 10 μl suspensi semen ditambah dengan 10 μl Na Cl fisiologis dihomogenkan dan ditetaskan pada obyek glass kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati berapa banyak spermatozoa yang bergerak progresif (maju ke depan) dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 kali. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil (bergerak maju) dan tidak motil sampai sebanyak 100 spermatozoa. Motilitas spermatozoa dibagi menjadi 4 kriteria yaitu bergerak maju ke depan, bergerak mundur, bergerak berputar atau ditempat dan tidak bergerak.

2. Viabilitas spermatozoa

Semen segar diteteskan pada gelas obyek ditambahkan eosin negrosin dicampur sampai homogen dan dibuat preparat ulas, dikeringkan diatas nyala api dengan cepat. Hasil ulasan diperiksa dengan mikroskop perbesaran 400 kali. Jumlah persentase spermatozoa yang mati dan hidup dihitung dengan ulangan 3 kali dan tiap perhitungan dalam 100 spermatozoa. Penilaian terhadap viabilitas spermatozoa adalah sebagai berikut: spermatozoa yang hidup kepalanya terlihat transparan atau berwarna jernih. Spermatozoa yang mati membran plasmanya rusak, permeabilitas meningkat akhirnya zat warna masuk ke dalam sel dan kepalanya nampak kemerahan. (Susilowati, dkk, 2010)

3. Pengujian keutuhan membrane plasma spermatozoa dengan Hipoosmotic Swelling Test. Sebanyak 1 ml larutan hipoosmotic (7,35 gram Na Citrat 2 H₂O, 13,52 gram fruktosa dilarutkan dalam 1000 ml aquades) ditambah dengan 0,1 ml spermatozoa kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan diamati dengan mikroskop pembesaran 400 x. Spermatozoa dengan membrane plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar karena membrane plasma spermatozoa masih berfungsi dengan baik dalam penyerapan air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang membrannya rusak ditandai dengan ekor yang lurus (Susilowati, 2007).

4. Pemeriksaan nekrosis spermatozoa

Persentase kematian spermatozoa yang ditandai dengan inti mengalami picnotis, kariorexis, dan kariolysis yang diketahui dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) yang ditemukan pada lima lapang pandang yang berbeda pada pembesaran 400 kali per 100 spermatozoa.

5. Pemeriksaan apoptosis spermatozoa dengan pewarnaan acridin orange

Pada penelitian ini digunakan pewarnaan acridin orange. Semen diteteskan pada gelas obyek, dibuat ulasaan kemudian direndam dengan methanol dan acid glacial (3:1) selama 30 menit. Gelas obyek diambil kemudian dikeringkan. Selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop fluorescen. Spermatozoa yang berwarna hijau adalah spermatozoa yang tidak mengalami apoptosis, sedangkan yang berwarna kuning sampai orange adalah spermatozoa yang mengalami apoptosis.

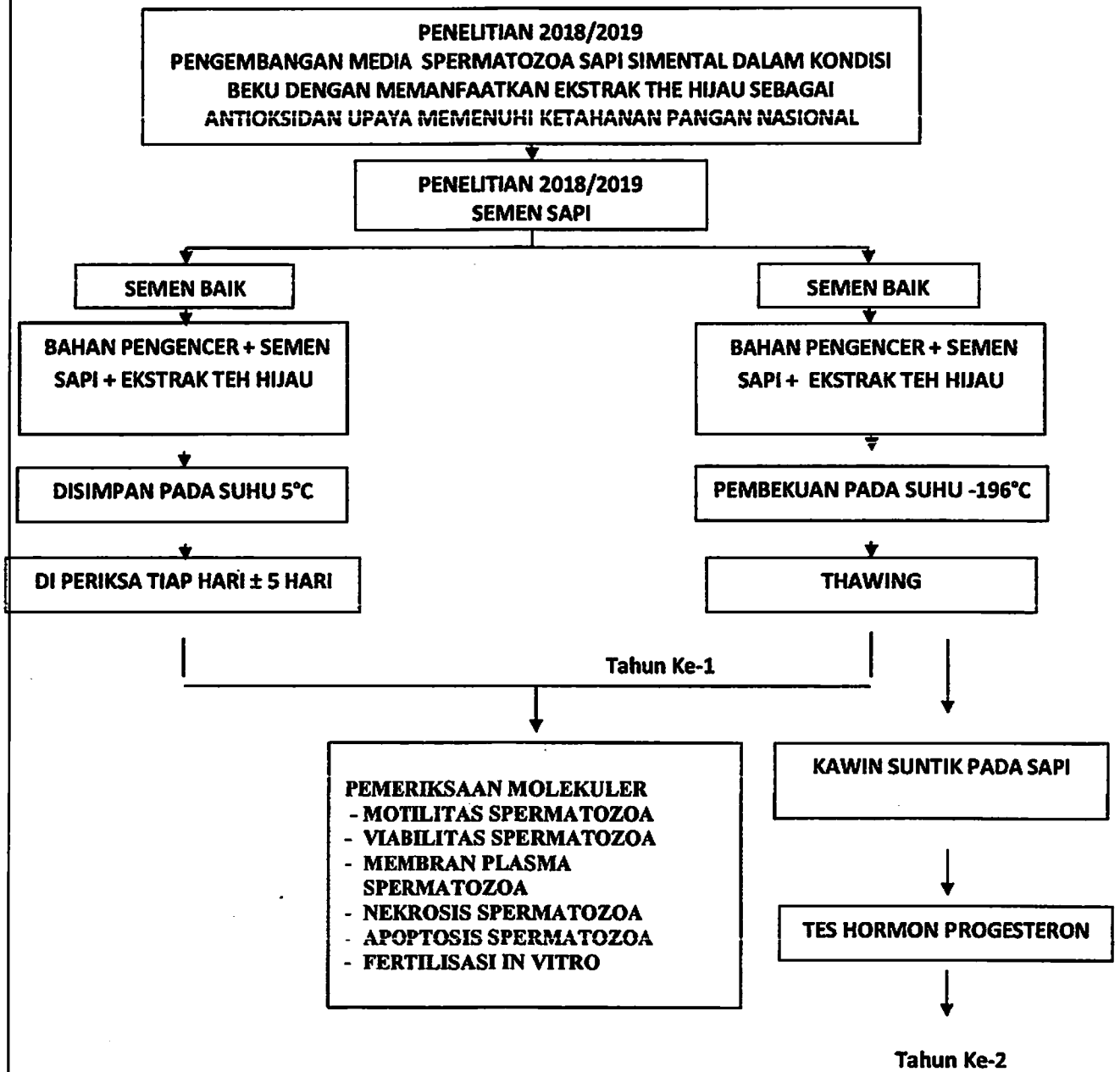
4.5. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini adalah rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ulangan yang sama. Penelitian ini menggunakan tiga perlakuan dan enam ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan perhitungan $t(n-1) \geq 15$ dengan t adalah perlakuan dan n adalah ulangan. Pada Rancangan Acak lengkap dikemukakan bahwa tidak ada faktor-faktor lain yang dapat dianggap berpengaruh terhadap hasil pengamatan selain perlakuan (Kusriningrum, 2010)

4.6. Analisa Data

Data hasil yang diperoleh ditabulasikan sesuai dengan variabel yang diamati. Hasil pengamatan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, ekspresi cytotkrom C, nekrosis dan integritas DNA dilakukan dengan F Test dan bila ada perbedaan dilanjutkan dengan Uji BNT. Sedangkan untuk angka kebuntingan dilakukan pencatatan data (deskriptif). (Santoso dan Fandy, 2001)

4.7.BAGAN ALIR PENELITIAN



BAB.5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil Penelitian

1. Semen Segar Sapi Simental

Penelitian ini membutuhkan semen segar yang berkualitas. Pemeriksaan makroskopis semen meliputi, volume, warna, bau, konsistensi dan pH. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis semen meliputi gerakan massa, individu, konsentrasi dan daya tahan hidup spermatozoa. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi Simental dapat dilihat pada tabel 1. Kualitas semen sapi yang digunakan untuk proses pembekuan harus mempunyai syarat motilitas progresif dan daya tahan hidupnya $\geq 70\%$.

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi Simental

Parameter	Rataan \pm SD
Volume (ml)	7,50 \pm 1,75
Konsistensi	kental
Warna	Putih kekuningan
Bau	khas
pH	6-7
Motilitas massa	+++
Motilitas individu progresif (%)	87,50 \pm 0,35
Daya tahan hidup (%)	90,75 \pm 0,40
Abnormalitas (%)	5,25 \pm 0,50
Konsentrasi (juta/ml)	1035 \pm 245,55

Keterangan :

Gerakan massa +++ adalah gerakan bersama-sama dari spermatozoa membentuk gelombang tebal, banyak dan cepat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semen sapi Simental yang ditampung berwarna putih kekuningan, bau khas, konsistensi kental, pH 6-7, volume 7,50 \pm 1,75 ml, konsentrasi 1035 \pm 245,55 juta/ml, motilitas masa +++ (pergerakan spermatozoa membentuk gelombang besar dan banyak), motilitas individu progresif 87,50 \pm 0,35%, viabilitas 90,75 \pm 0,40%. Pada umumnya volume semen akan bertambah banyak sesuai dengan umur, besar tubuh, perubahan keadaan, kesehatan organ reproduksi dan frekuensi penampungan semen. Warna, konsistensi semen dan konsentrasi spermatozoa mempunyai hubungan erat satu sama lain. Semakin encer suatu semen maka konsentrasi spermatozoa akan rendah dan warna semen

semakin pucat. Konsistensi semen tergantung pada perbandingan spermatozoa dan plasma semen (Evans dan Maxwell, 1987). Derajat keasaman sangat mempengaruhi daya hidup spermatozoa. Apabila derajat keasaman (pH) semen tinggi atau rendah akan menyebabkan spermatozoa tersebut mati. Derajat keasaman semen dipengaruhi oleh banyaknya asam laktat yang dihasilkan. Asam laktat merupakan hasil akhir metabolisme spermatozoa (Hardijanto, dkk, 2010).

2. Pemeriksaan kualitas semen beku Sapi Simental posthawing setelah penambahan ekstrak teh hijau dalam pengencer susu kuning telur.

Motilitas individu, viabilitas, membran plasma utuh, nekrosis dan apoptosis spermatozoa sapi Simentalposthawing dapat dilihat pada tabel 2.

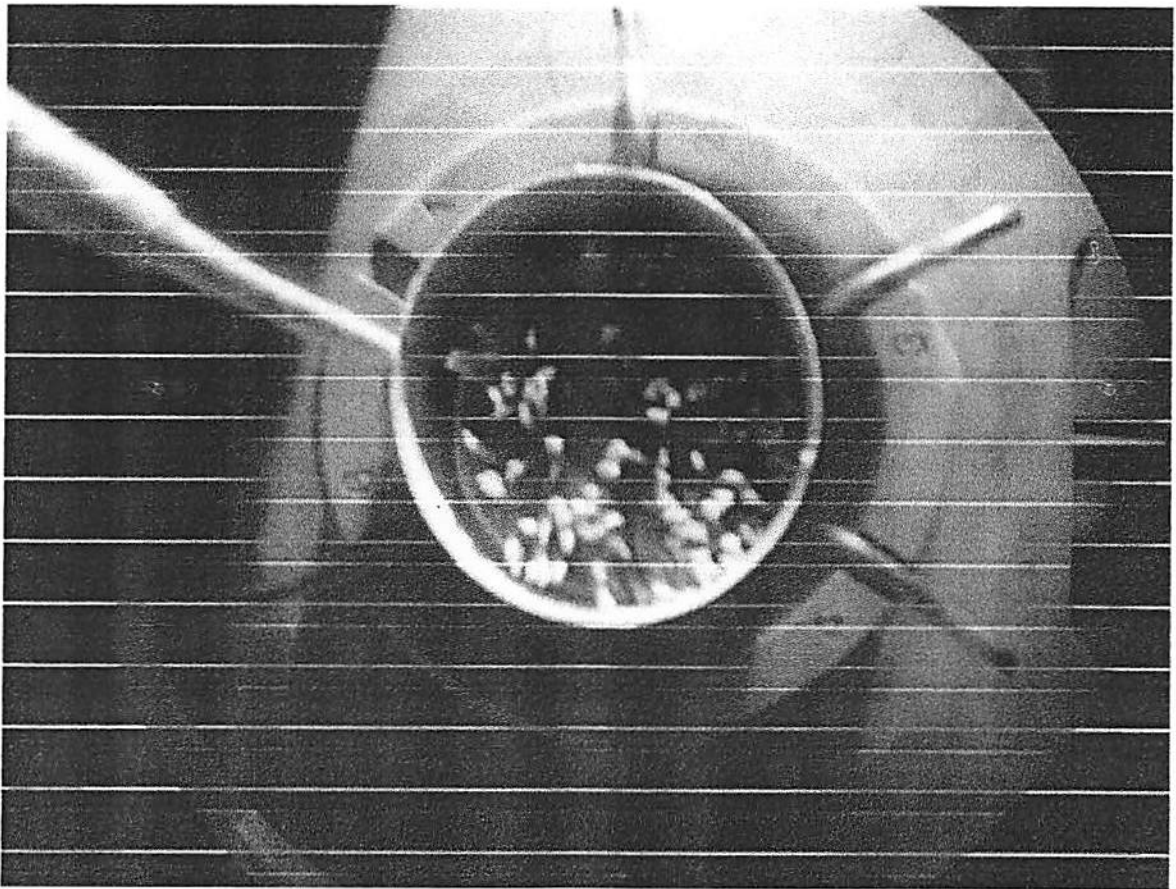
Tabel. 2. Rata-rata dan SD persentase kualitas spermatozoa sapi Simental posthawing

Parameter	PO	PI (0,5 mg)	PII (1 mg)	PIII (1,5 mg)
Motilitas (%)	45,25 ^c ±3,74	55,30 ^b ±3,32	69,17 ^a ±1,47	52,83 ^b ±3,35
Viabilitas (%)	47,50 ^c ±5,24	57,00 ^b ±3,16	70,67 ^a ±1,75	55,33 ^b ±2,25
Membran plasma utuh (%)	42,67 ^c ±2,94	54,67 ^b ±3,77	69,33 ^a ±1,21	52,83 ^b ±3,18
Nekrosis (%)	11,17 ^c ±1,47	6,83 ^b ±1,17	2,17 ^a ±0,75	6,17 ^b ±0,75
Apoptosis(%)	10,33 ^c ±1,63	6,50 ^b ±1,05	2,00 ^a ±0,89	6,33 ^b ±1,21

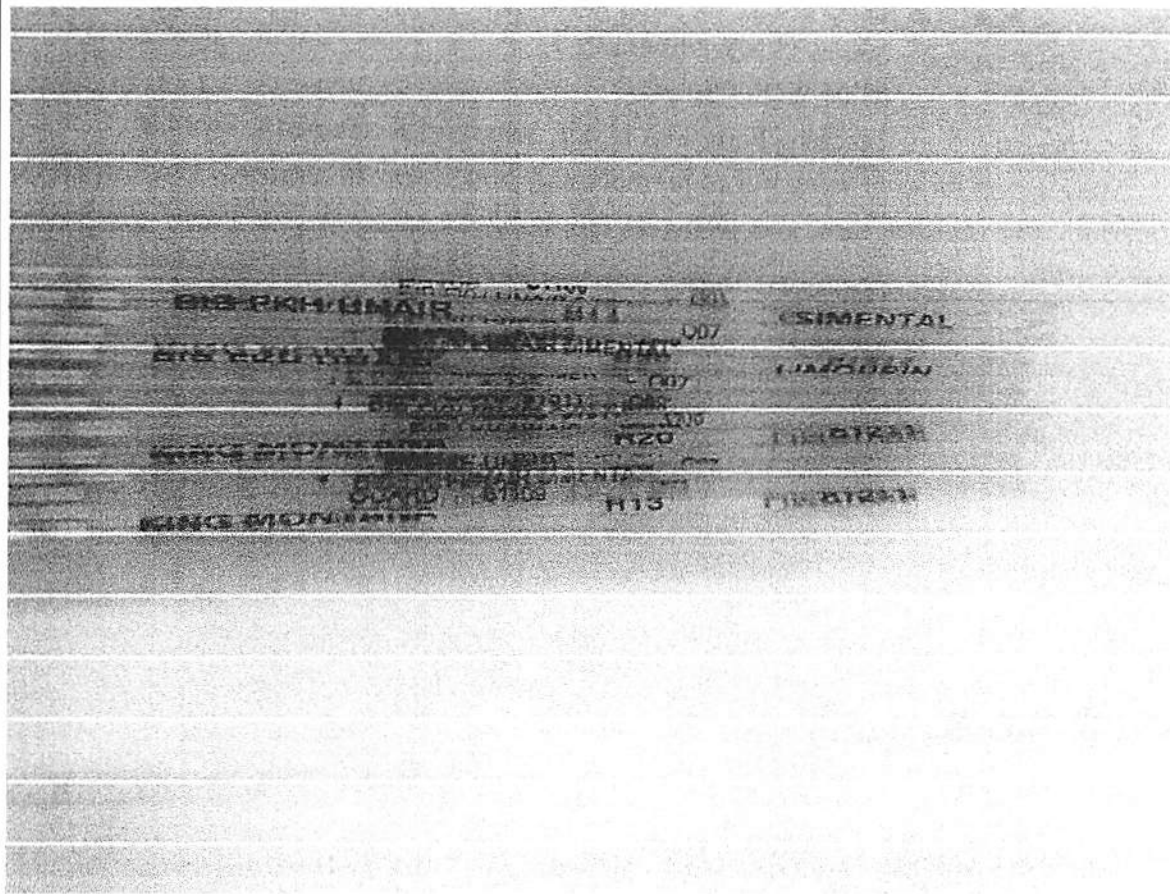
Notasi huruf yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$).

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur untuk semen sapi Simental menghasilkan perbedaan yang nyata pada motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, nekrosis dan apoptosis spermatozoa. Pengamatan dalam bahan pengencer semen sapi Simental tanpa penambahan ekstrak teh

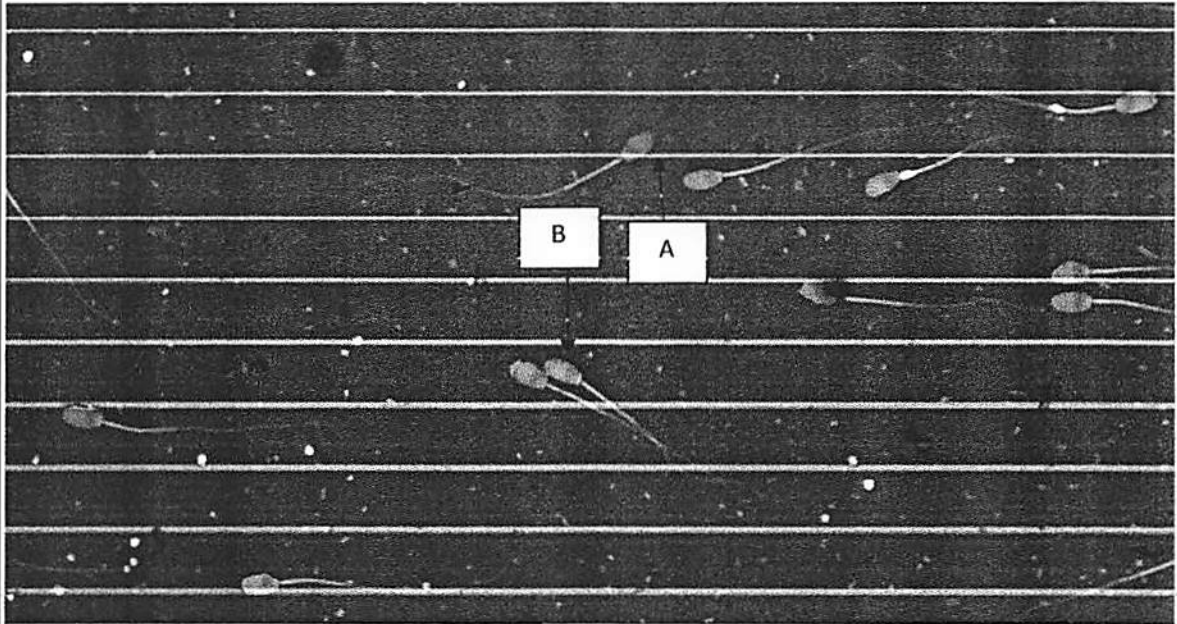
hijau menunjukkan persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh spermatozoa yang paling rendah sedangkan persentase nekrosis dan apoptosis menunjukkan persentase nekrosis dan apoptosis paling tinggi. Uji Multivariat terhadap motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, nekrosis dan apoptosis terdapat perbedaan yang nyata $p < 0,05$ antara P0, P1, P2 dan P3. Pengamatan persentase motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, yang tertinggi dan nekrosis serta apoptosis yang terendah terdapat pada kelompok P2. Sedangkan hasil pengamatan kualitas spermatozoa antara kelompok P1 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata $p > 0,05$.



Gambar 1. Semen beku sapi Simental (bentuk straw) dalam kontainer

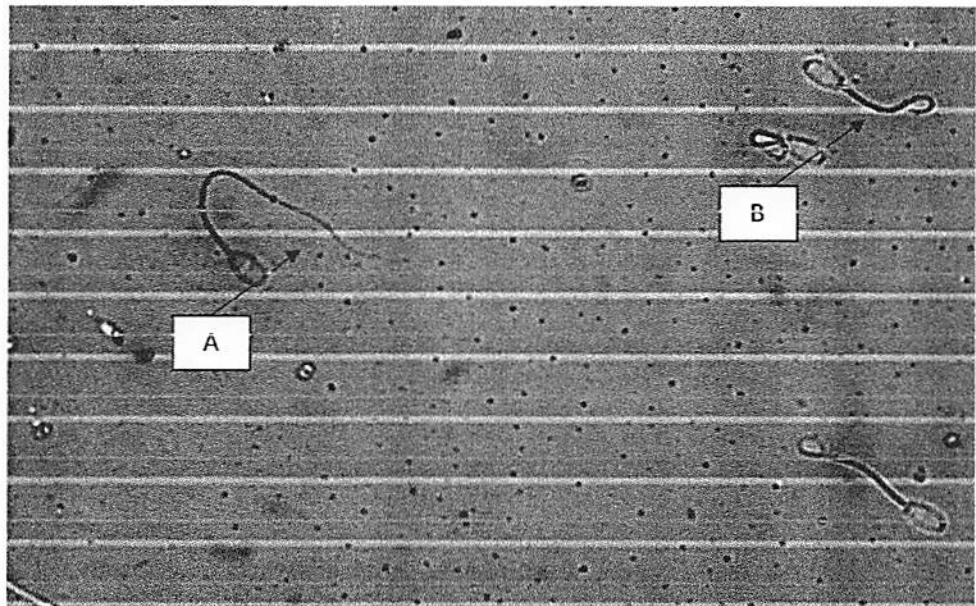


Gambar 2. Straw sapi Simental yang di label



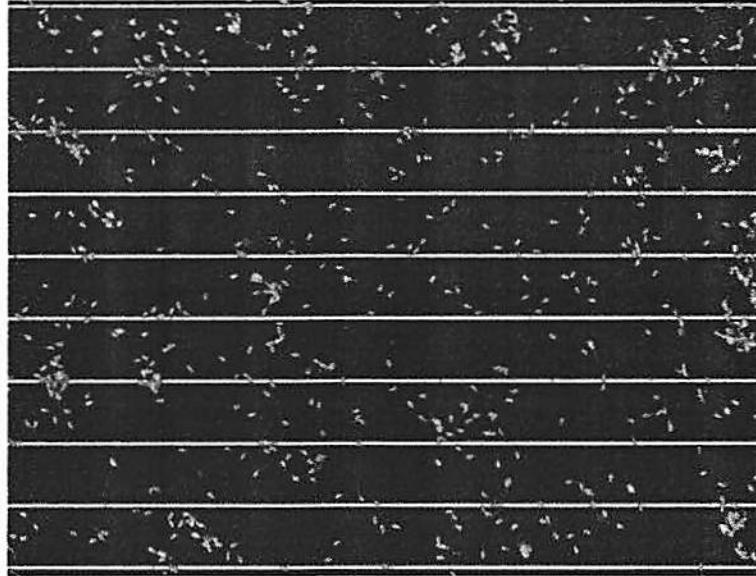
Gambar 3. Spermatozoa dengan pewarnaan eosin negrosin

- A. Spermatozoa mati : kepala berwarna merah keunguan
- B. Spermatozoa hidup : kepala berwarna bening (transparan).



Gambar 4. Spermatozoa dengan Hipoosmotic Swelling Test

- A.Spermatozoa yang membrannya rusak (Ekor spermatozoa lurus)
- B.Spermatozoa yang membrannya utuh (Ekor spermatozoa melingkar)



Gambar 5. Spermatozoa dengan Pewarnaan Acridin Orange
A.Spermatozoa yang apoptosis (berwarna kuning)
B.Spermatozoa yang tidak apoptosis (berwarna hijau)

Pemeriksaan kualitas semen segar perlu dilakukan untuk mengetahui spermatozoa yang akan digunakan untuk penelitian memenuhi syarat atau tidak. Kualitas semen dapat diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis (Susilowati dkk, 2010). Pemeriksaan semen secara makroskopis meliputi pemeriksaan volume, konsistensi, bau, warna dan pH. Pemeriksaan secara mikroskopis meliputi gerakan massa, individu, konsentrasi dan persentase spermatozoa yang hidup. Hasil penelitian ini, semen yang digunakan untuk pembekuan semen sapi Simental memenuhi syarat dan memiliki kualitas yang bagus. Menurut Permadi dkk (2013) yang menyebutkan bahwa semen segar dinyatakan memenuhi syarat untuk perlakuan dengan kriteria motilitas dan viabilitas $\geq 70\%$.

Pada penelitian ini semen segar sapi Simental yang digunakan memiliki warna putih kekuningan. Menurut Salmah (2014), semen normal akan berwarna putih kekuningan dan diperkirakan memiliki konsentrasi spermatozoa yang tinggi. Warna semen akan berubah menjadi tidak normal jika terdapat kelainan pada alat kelamin serta akan memiliki bau yang busuk atau anyir yang merupakan indikasi adanya radang pada saluran kelamin (Hardijanto

dkk, 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH semen sapi Simental mempunyai nilai antara 6-7. Menurut Susilowati dkk (2010), menyatakan bahwa semen sapi yang subur memiliki pH berkisar 6,4-6,8. Apabila pH terlalu asam atau basa biasanya spermatozoanya banyak yang mati. Konsentrasi spermatozoa hasil penelitian adalah $1035 \pm 245,55$ juta/ml. Konsentrasi spermatozoa sapi tersebut menunjukkan batas normal 1500-3000 juta/ml (Susilowati dkk, 2010).

Berdasarkan uraian hasil diatas bahwa semen segar sapi Simental yang digunakan memiliki kualitas yang disyaratkan sehingga dapat diproses lebih lanjut yaitu untuk proses pembekuan..

Motilitas sangat penting untuk fertilisasi karena motilitas dapat menunjukkan gambaran spermatozoa yang sehat. Motilitas dapat membantu transport spermatozoa dari luar untuk mencapai tempat terjadinya fertilisasi (Garner and Hafez, 2000). Viabilitas merupakan daya tahan hidup spermatozoa, apabila spermatozoa mati maka permeabilitas membrannya rusak (Salisbury dan Van Demark, 1985). Membran spermatozoa yang mati tidak permeabel terhadap zat warna atau memiliki afinitas yang rendah sehingga menyebabkan yang mati berwarna merah (Sugiarti, dkk., 2004). Membran plasma berfungsi melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik dan sebagai filter pertukaran zat-zat intra dan ekstraseluler (Garner and Hafez, 2000). Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa karena akan berpengaruh terhadap metabolisme yang berhubungan dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa. (Soler *et al*, 2003).

Pada proses pembekuan semen akan terjadi stress oksidatif. Stress tersebut akan menyebabkan peningkatan Reactive Oxygen Species (ROS), kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA. Fosfolipid pada membran plasma spermatozoa memiliki kadar yang tinggi sehingga rentan terhadap ROS (Sanocka and Kurpisz, 2004). ROS dalam kadar yang tinggi akan berpotensi toksik terhadap kualitas dan

fungsi spermatozoa (Saleh and Agarwal, 2002). Bila kadar ROS tidak mampu dinetralisir oleh antioksidan yang ada di spermatozoa dapat menyebabkan peroksidasi lipid (Alvarez dan Storey, 1995).

Pada penelitian ini kualitas spermatozoa sapi Simental dengan penambahan ekstrak teh hijau pada proses pembekuan dengan dosis 0,5 mg, 1 mg dan 1,5 mg / 100 ml bahan pengencer sama-sama meningkat, tetapi yang paling bagus adalah di kelompok pemberian ekstrak teh hijau sebesar 1 mg / 100 ml bahan pengencer, hal tersebut karena ekstrak teh hijau mempunyai senyawa antioksidan berupa polifenol yaitu senyawa katekin. Teh hijau dapat mengurangi produksi ROS dengan melengkapi elektron yang tidak berpasangan sehingga mengurangi kerusakan protein, membran lipid dan asam nukleat (Naghma dan Mukhtar, 2007). Katekin dapat mencegah dan melawan radikal bebas pada membran sel sehingga sel tidak mati, sel tidak rusak dan berfungsi kembali untuk proses metabolisme. Kelompok hydroxyl dari katekin bertindak sebagai antioksidan yang dapat menurunkan produksi ROS (Armoskaite *et al*, 2011). Selain itu teh hijau mengandung vitamin C dan vitamin E yang juga bersifat antioksidan (Sundari dkk, 2009). Pada kelompok PI dan PIII yaitu pemberian ekstrak the hijau 0,5 mg dan 1,5 mg / 100 ml bahan pengencer kualitas spermatozoa sapi Simental posthawing tidak berbeda nyata, hal tersebut karena penambahan antioksidan dengan kadar rendah belum mencukupi untuk menangkal radikal bebas sedangkan bila antioksidan terlalu tinggi juga akan menyebabkan toksik. Sifat toksik disebabkan oleh pemberian antioksidan yang berlebihan sehingga menyebabkan meningkatnya tekanan osmosis dan menyebabkan kerusakan membrane spermatozoa (Wilandari dkk, 2013) sedangkan viabilitas spermatozoa juga terganggu yang dikarenakan kandungan fenolnya tinggi. Kandungan fenol yang tinggi akan bersifat toksik dan menyebabkan kematian sel (Putranti, 2010). Sesuai dengan pendapat Delvita (2014) menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak the hitam semakin menurunkan viabilitas spermatozoa mencit yang juga akan berpengaruh terhadap motilitas.

5.2. Luaran Yang Dicapai

1. Seminar International (VMIC II 2018)

**2. Publish di Jurnal International Philippine Jurnal of Veterinary Medicine. Publish ;
Philipp.J.Vet.Med., 55(2) : 127-134, 2018.**

3. Draft HKI

BAB. 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahun II (2019) adalah kawin suntik pada sapi Simental dengan menggunakan semen beku hasil penelitian tahun I (2018).



BAB. 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

1. Penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa sapi Simental post thawing.
2. Penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa sapi Simental post thawing
3. Penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat meningkatkan persentase membrane plasma utuh spermatozoa sapi Simental post thawing.
4. Penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat menurunkan persentase kejadian nekrosis spermatozoa sapi Simental post thawing
5. Penambahan ekstrak teh hijau dalam bahan pengencer susu kuning telur dapat menurunkan persentase apoptosis spermatozoa sapi Simental post thawing.

7.2. SARAN

Sebaiknya pada proses pembekuan semen sapi Simental dalam bahan pengencer susu kuning telur ditambahkan ekstrak teh hijau 1 mg / 100 ml bahan pengencer

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Ramadan, A Mohamed AB. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.*79:829-843
- Aivarez, J.G and Storey, B.T. 1995. Differential incorporation of fatty acid into and peroxidative loss of fatty acid from phospholipid of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-345.
- Armoskaite V, Ramanauskiene K, Maruska A, Razukas A, Dagilyte A, Baranauskas A and Breidis V. 2011. The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts. *J. Med. Plant Res* 5: 811-816.
- Chen,Z.Y., Zhu,D, Tsang and Y.Huang. 2001. Degradation of Green Tea Catechin in tea drinks. *Journal of Agricultur and Food Chemistry.* 49:477-482.
- Crompton M, Virji S and Ward JM, 1998. Cyclophilin-D bind strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258:729-735.
- Delvita,R, 2014. Potensi Antifertilitas Ekstrak Teh Hitam pada Mencit (*Mus Musculus L*) Jantan. *Jurnal Saintek.* 6(2) : 181-188.
- Garner and Hafez, E.S.E, 2000. *Reproduction in Farm Animal.* 7th Edition. Philadelphia. Baltimore. New York London.
- Evans,G and M.W.C.Maxwell, 1988. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat.* Butherworths, Sydney.
- Foster, S. 2000. Green tea (*Camellia sinensis*) Edisi 5. *Alternative Medicine Review.*
- Hayati, A, 2011. *Spermatologi.* Pusat Penerbit dan Percetakan Universitas Airlangga.
- Kasai, M. 1996. Simple and Efficient Methods for Vitrification of Mammalian Embryos. *Animal Reproduction Sciences.* 42(1): 67-75
- Kusriningrum, R.S.2010.*Perancangan Percobaan.* Airlangga University Press. Surabaya.
- Layek,SS; Mohanty TK; Kumaresan,A dan Park JE.2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders.*Animal Reproduction Science.*172 :1-9
- Lessard, C.,S. Parent, P. LEclerc, J.L. bailey and R. Sullivan, 2000. Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Journal Andrology.*21:700-707.
- Li LY, Luo X, Wang X, 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase whn released from mitokondria. *Nature* 6842: 95-99.

- Naghma, K and H Mukhtar. 2007. Tea Polyphenols for Health Promotion. *Life Science*. 81 (7) : 519-533.
- McGavin MD and Zachary JF (Eds), 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4 th Ed Mosby Elsevier. Philadelphia, PA
- Muino-Blanco, T.; R. Perez –Pe and J.A. Cebrian Perez. 2008. Seminal Plasma Protein and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animal*, 43:18-31.
- Munoz O.V; Briand L.A; Bancharif D; Anton M, Deserches S; Smith E; Thorin Cand Tainturier D. 2010. Effect of Low Density, Spermatozoon Concentration and Glycerol on Functional and Motility Parameters of Bull Spermatozoa During Storage at 4oc. *Asian J. Androl*. 13(2):281-286.
- Permadi, DS; Taswin R.T dan Pambudi Y. 2013. Produksi Semen Segar dan Semen Beku Sapi Pejantan dengan Body Condition Score (BCS) yang Berbeda di Balai inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Ilmiah Peternakan I* (3) : 759-767.
- Peterson QP, Goode DR, West DC, Botham RC and Hergenrother PJ. 2010. Preparation of the caspase -3/7 substrate AC-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. *Nature Protocols* 5 : 294-302. Published online 28 January 2010.
- Putranti, O.D., Kustono dan Ismaya, 2010. Pengaruh Penambahan Crude Tannin Pada Sperma Cair Kambing Peranakan Ettawa yang Disimpan Selama 14 Hari Terhadap Viabilitas Spermatozoa . *Jurnal Buletin Peternakan*. 34(1) : 1-7.
- Raza, H and A. John, 2008. In Vitro Effects of Tea Poliphenols on Redox Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis in PC12. *Cells Ann. N. Y. Acad Sci* . 1138:358-365.
- Saleh R. Adan Agarwal, A, 2002. Oxidative Stress and Male Infertility. From Research Bench to Clinical Practice. *Journal Andrology*. 23(6): 737-752.
- Salmah, N. 2014. Motilitas, persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Bali Pada Pengencer Andromed dan Tris Kuning Telur (Skripsi) Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin Makasar.
- Santoso, S dan Fandy, T, 2001. Riset Pemasaran, Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. PT Gramedia . Jakarta.
- Salisbury, G.W and N.L. VanDemark, 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Terjemahan R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Subrata, I.M, 1998. Pemberian Fosfolipid Essensial dan Antioksidan (Vitamin E) Meningkatkan Integritas Membran Spermatozoa. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sugiarti, T, Triwulaningsih E, Situmorang P, Sianturi R dan Kusumaningrum DA. 2004. Penggunaan Katalase Dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Balai Penelitian Ternak. Bogor.

- Sulistyo,J, Nurdiana, H.Elizar. 2003. Pengembangan Kerja Sama Riset, Teknologi, Produksi dan Pemasaran Produk Hilir Teh. Prosiding “Simposium Teh Nasional 2003” Pusat penelitian Teh dan Kina Gambung Bandung.
- Sundari, D., Budi, N dan M. Wien, W. 2009. Toksisitas Akut (LD50) dan Uji Gelagat Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) pada Mencit. Media Peneliti dan Pengembang Kesehatan, 14(4): 198-203.
- Susilowati,S. Potensi Biologis Insulin Like Growth Factor-I Complex Plasma Seminalis Kambing Hasil Sentrifugasi, 2007. Disertasi. Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Susilowati S, Hardijanto, Tri Wahyu Suprayogi, Trilas Sardjito dan Tatik Hernawati. 2010. Buku Petunjuk Praktikum Fakultas Kedokteran Hewan, Airlanngga University Press.
- Susilowati, S dan Hernawati ,T, 2013. Protein Plasma Seminalis Dan Pembekuan Semen Kambing .Hand Out. Fakuitas Kedokteran Hewan Unair.
- Soler, AJ., Gusman MDP and Garde JJ, 2003. Storage of Red Deer Epididymides for four days at 5° C. Effect of Sperm Motility, Viability and Morphology Integrity. J Exp. Zool. 295A:188-199.
- Syah, A.N.A. 2006. Taklukan Penyakit dengan Teh Hijau. Penerbit Agrimedia Pustaka. Jakarta.
- Toelihere, M.R, 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa Bandung.
- Wilandari,T.D ., Abdul A dan Ibrahim M. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Sarang Semut (*Mymecodia pedens* Merr & Perry) terhadap Morfologi Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus Norvegicus* L) yang dipapar Asap Rokok. Universitas Negeri Gorontalo.
- Yulianto,P dan C. saparinto, 2014. Beternak Sapi Limousin. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Zelpina,E; B. Rosadi dan T Sumarsono, 2012. Kualitas Spermatozoa Post Thawing dari Semen Beku Sapi Perah. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan. 15(2): 94-102.
- Zou H, Yuchen L, Xuesing L, Wang X, 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase 9. J. Biol Chem 274 : 11549-11556
- Zulkair, M. 2016. Pengaruh Substitusi Sari Buah Tomat (*Lycopersion esculentum*Mill.) pada Media Pengencer Kuning Telur Sitrat Terhadap Viabilitas dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa Domba Ekor Gemuk pada Suhu Penyimpanan 3-5°C. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Hal 47.

Lampiran 1. Artikel ilmiah pada seminar internasional (VMIC 2018)

GREEN TEA EXTRACT AS ANTIOXIDANT OF SIMENTAL BULL SPERM IN COLD TEMPERATURE STORAGE

Triilas Sardjito¹, Rochmah Kumiasanti², Oky Seiyu Widodo³, and Suherni Susilowati¹

¹Department of Veterinary Reproduction, ²Department of Basic Veterinary Medicine, ³Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondent : suhernifkhunair@gmail.com

Abstract.

The aim of this study was to improve the quality of Simental bull sperm in cold temperature storage by addition green tea extract (*Camellia sinensis*). Ejaculate collected from four Simental bulls, evaluated and placed : 37°C water bath before process. There were four experiments with six repetitions. The semen of Simental bull diluted with milk-egg yolk supplemented with green tea extract of 0 (as control), 0,05; 0,1 and 0,15 mg/100 mL extender respectively. Then the samples stored in cold temperature (5°C) and evaluated every day. The result showed that sperm motility, viability and membrane integrity were significantly different ($p < 0.05$) among the treatments. The conclusion of this study is adding of green tea extract with 0,1 mg/100 mL extender is better for maintain motility, viability, and membrane integrity Simental bull sperm.

Keywords: green tea extract, cold temperature, sperm quality, bull

1. Introduction

Artificial insemination is the beginning of reproductive biotechnology in the male animals. Artificial insemination role in the programs of breeding cattles and can use diluted fresh semen, liquid semen or frozen semen. One of the supporting factors in efforts to optimize the artificial insemination program for goats is the availability of quality bull semen. The use of liquid semen for artificial insemination in cattle still raises the problem mainly related to the right kind of diluents to maintain the quality of spermatozoa during dilution and insemination. The main constraints of the process of cooling of bull semen is the destruction of function and membrane structure and the ability of spermatozoa to survive (18). Thus, it is

very important to identify the factors or conditions which affect normal sperm functions. One of the most important factors contributing to affect normal sperm functions has been reported to be oxidative stress (8,9). Among various causes oxidative stress has been attributed to affect the fertility status and physiology of spermatozoa (3). The main destructive aspects of oxidative stress are the production of Reactive Oxygen Species (ROS) (26). ROS can cause cell dysfunction through changes in the function of protein structures (enzymes, receptors, antibodies, matrix formers and cytoskeleton), DNA chains and cell membranes, resulting in disrupted cell integrity (23). In low concentrations ROS plays an important role as a mediator of normal spermatozoa function and involved in hyperactivation, capacitation, acrosome reactions as well as fusion of spermatozoa with egg cells (16) but when the increase in ROS concentrations above normal values and can not be neutralized by antioxidants present in spermatozoa, may cause lipid peroxidation (5). The end result of this reaction is the breaking of the chain of fatty acids into various aldehyde compounds such as Malondialdehyde (MDA), 9 hydrocinonemes and various hydrocarbons and ethane that can damage cell membranes (12,23). The breakdown of the cell membrane will increase the permeability of the cell membrane, so materials that should not pass through the cell membrane can freely exit the cell and ultimately the integrity of the spermatozoa is impaired (2).

Against ROS attack, spermatozoa are well equipped with a powerful defense system of antioxidants (21). This researches the impact of oxidative stress and ROS on spermatozoa quality of Simental bull. In this study the researchers wanted to examine the addition of green tea extract in yolk milk diluent on Simental bull semen stored at cold temperatures.

Recently plant-derived antioxidants have been getting major focus due to their lower cytotoxicity and are considered to be better than synthetic antioxidants (13). Plant-derived extracts are excellent sources of the natural antioxidant. Several studies documented that the plant-derived antioxidant are associated with improvement of spermatozoa in freezing

diluents. Antioxidative protection property of green tea extract on the quality of canine, avian and mouse semen have been confirmed (4). According the research by (15), adding extract green tea with dose 0,25, 0,5, 0,75 and 1,0 % can maintained quality of sperm Achai bull post-thawed .

2. Material and Methods

2.1. Experimental Animals

Semen samples from four Simental bulls (5 years of age) were use in this study. The Simental bulls were maintained under uniform nutritional condition. This study included a complete randomized method which consists of four groups. Each group consisted of 12 repetitions Ejaculated were collected twice a week from the male bulls with the aid of an artificial vagina, immediately after collection was brought to the laboratory and semen parameters were assessed , including volume, pH, consistency, color and concentration of semen. After male bulls semen underwent microscopic and macroscopic examination (appiying prequalification that the percentages of sperm motility and viability should be 70% or above).

2.2. Semen Dilution

One hundred skim milk added with 100 cc aquadest, heated until 92-95°C and then colded until 20-27°C temperature. On the other hand, the eggs are cleaned and then separated the yolks, then measure 5 cc of egg yolks and then added with cold milk until 100 cc. Added with Penicillin 1.000 IU/cc diluents and Streptomycin 1 mg/ cc diluents. Diluents was prepared divided into four groups. Controlled groups (P0) refers to diluents + semen of Simental bulls (without extract green tea). Group I (PI) refers to diluents + semen of Simental bulls + extract green tea (0.05mg/ 100 cc diluents. Group II (PII) refers to diluents + semen of Simental bulls + extract green tea (0.1 mg/ 100 cc diluents. Group III (PIII) refers to diluents

+ semen of Simental bulls + extract green tea (0.15 mg/ 100 cc diluents. All of groups colded at 5⁰C and then examined sperm motility, viability and membrane integrity.

2.3. Green tea extract preparation

Green tea leaves was dried, milled with a grinding machine, and then soaked with 96% ethanol solvent and allowed to stand for 3 days, covered with aluminium foil to prevent evaporation. Futhermore, the green tea solution was squeezed by using filter paper, and then the filtrate was evaporated at 50⁰C at 45 rpm speed of rotator to separate the solvent with extract green tea leaves to obtain thickened extract. The extract was evaporated in acid chamber until formed solid extract and then freeze dried.

2.4. Semen Evaluation

Sperm motility was assessed using a phase contrast microscope. The motility of sperm was analyzed by mixing the semen gently and placing a 10 µl drop diluents of semen on a slide covered with a glass cover slip from five selected representative fields. Samples were selecterd randomly from 3 fields, for a total of 100 cells (24).

Eosin negrosin staining was used to evaluate the viability (live/dead in %) of sperm. One drop of semen was placed on a object glass slide and this sample mixed with one drop of eosin – negrosin solution. The mixture was smeared on the the glass slide and allowed to dry. One hundred sperm were evaluated in a least five different fields in each smear under a light microscope. Observed and recorded the unstained heads as live of sperm and stained or partial stained heads of as dead spem (24).

Hypo-osmotic swelling test (HOS) was used to evaluate plasma membrane integrity (11). A total of 100 µl of semen was mixed with one cc of hipoosmotic solution (containing 13,51 g of fructose and 7,35 g sodium citrate in 1000 cc of distilled water. The mixture was incubated at room temperature for 30 min. Following incubation, 15 µl of sample was placed on a slide, covered with a cover slip and observed under a light microscope. The sperm were

categorized according to the observed under a light microscope. At least 100 sperm were observed and the result were recorded as percentages. Spermatozoa with intact plasma membrane are characterized by a circular sperm tail because the plasma membrane of sperm still work well in water absorption in a hypotonic environment. Meanwhile damaged sperm membrane marked by a straight tail (19).

2.5. Statistical Analysis

All data were expressed as the mean values \pm SD The statistical significances of the effects of sperm quality (motility, viability and membrane integrity) were determined by Anova, P-values \leq 0.05 were considered to be significantly different (22).

3.Result

Fresh Simental bull semen used in this research had undergone macroscopic and microscopic examinations. Macroscopic examination included examination on Simental bull semen volume, color, odor, consistency and pH. Meanwhile, microscopic examinations investigated sperm mass motility, individual motility, concentration, viability and membrane integrity. The result of microscopic and macroscopic examinations was presented on Table 1.

Table 1. Macroscopic and Microscopic Examinations Simental Bull Semen

Indicator	Character
Volume (cc)	7.25 \pm 0.50
Consistency	Viscous
Color	Milky white to yellowish
Odor	Typical
pH	6-7
Mass Movement(%)	+++
Individual Movement(%)	Progresif (90 \pm 0.75)

The research shows that Simental bull semen stored has milky white to yellowish colour, typical odor, viscous consistency, pH=6-7, volume 7.25 ± 0.50 cc, concentration 1045×10^6 , mass movement +++ (the motion formed big and many waves), progressive individual movement (90 ± 0.75) and membrane integrity $86 \pm 1.05\%$. The percentages of sperm motility, viability, membrane integrity after adding extract green tea in diluents on the cold temperature were show in table 2,3 and 4. Sperm motility, viability and membrane integrity were significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Percentage of Simental bull's semen viability in the milk egg yolk diluents + extract green tea which stored in cold temperature (5°C) and evaluated everyday.

Treatments	Day 1 (%)	Day 2 (%)	Day 3 (%)	Day 4 (%)	Day 5 (%)
P0	71.50 ± 0.60^c	66.17 ± 0.40^c	54.50 ± 0.20^c	44.17 ± 6.08^c	36.83 ± 0.70^c
PI	77.33 ± 0.45^b	66.83 ± 0.20^b	55.83 ± 0.20^b	50.50 ± 0.25^b	47.33 ± 0.50^b
PII	88.50 ± 0.10^a	80.50 ± 0.50^a	72.17 ± 0.45^a	62.33 ± 0.20^a	56.17 ± 0.60^a
PIII	73.00 ± 0.20^b	70.17 ± 0.20^b	62.50 ± 0.50^b	55.67 ± 0.50^b	50.33 ± 0.70^b

Note : Value in the same row with different superscript indicate significant difference at ($p < 0.05$)

Table 3. Percentage of Simental bull's semen viability in the milk egg yolk diluents + extract green tea which stored in cold temperature (5°C) and evaluated everyday.

Treatments	Day 1 (%)	Day 2 (%)	Day 3 (%)	Day 4 (%)	Day 5 (%)
P0	82.67 ± 0.75^c	74.50 ± 0.30^c	57.00 ± 0.40^c	48.00 ± 0.20^c	41.17 ± 0.80^c
PI	85.50 ± 0.45^b	75.67 ± 0.30^b	64.00 ± 0.10^b	55.60 ± 0.20^b	49.33 ± 0.50^b
PII	89.50 ± 0.25^b	85.50 ± 0.15^a	80.67 ± 0.50^a	69.00 ± 0.20^a	60.00 ± 0.45^a
PIII	80.58 ± 0.25^a	72.54 ± 0.05^b	70.50 ± 0.50^b	59.00 ± 0.90^b	55.50 ± 0.20^b

Note : Value in the same row with different superscript indicate significant difference at ($p < 0.05$)

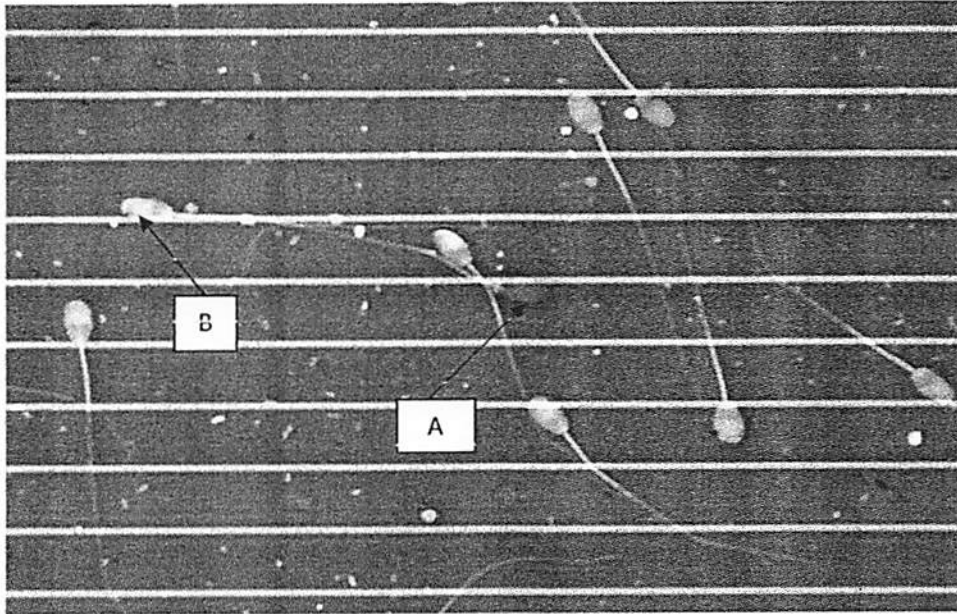


Figure 1. Live sperm (A. Uncoloured head) and dead (B. Coloured head)

Table 4. Percentage of Simental bull's semen membrane integrity in the milk egg yolk diluents + extract green tea which stored in cold temperature (5⁰C) and evaluated everyday.

Treatments	Day 1 (%)	Day 2 (%)	Day 3 (%)	Day 4 (%)	Day 5 (%)
P0	81,00±0,80 ^c	72,33±0,10 ^c	56,33±0,25 ^c	47,83±0,70 ^c	17,83±0,60 ^c
PI	84,17±0,90 ^b	71,00±0,10 ^b	62,07±0,80 ^b	52,67±0,80 ^b	18,67±0,50 ^b
PII	88,65±0,10 ^a	83,53±0,30 ^a	78,50±0,30 ^a	65,17±0,10 ^a	22,83±0,70 ^a
PIII	78,80±0,30 ^b	70,50±0,20 ^b	68,50±0,25 ^b	56,33±0,75 ^b	25,50±0,50 ^b

Note : Value in the same row with different superscript indicate significant difference at (p<0.05)

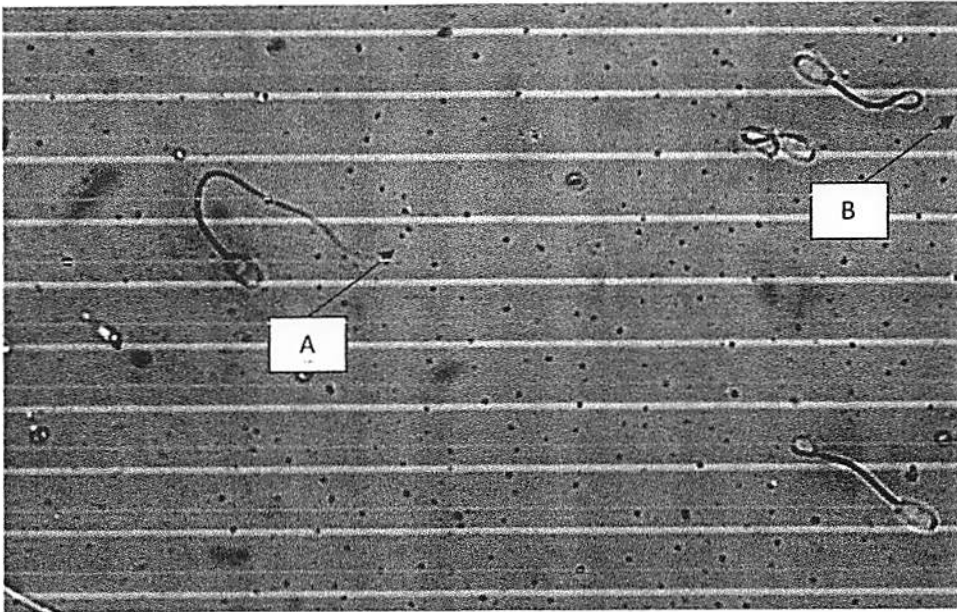


Figure 2. Damage membrane sperm (A. Straight spermatozoa tail) and intact membrane sperm (B. Round spermatozoa tail)

4. Discussion

Based on the results of fresh semen assessment in Table 1, it can be concluded that the fresh Simental bull semen used in this study has a good category and qualify for dilution. This is in accordance with the requirements of Toelihere (1985) that there are requirements to be fulfilled in the process of cooling or freezing of semen is the percentage of motility and viability of spermatozoa $\geq 70\%$ and mass movement ++ / +++.

Motility or progressive force of spermatozoa after the process is always used as the easiest grip in semen assessment for artificial insemination using liquid semen. This progressive force has an important role to play in fertilization (7). The character of spermatozoa movement for each species is different and varies according to diluter type and environment temperature (25). Spermatozoa movement was enhanced by energy in form Adenosine Triphosphat (ATP) produced by mitochondria and cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) (27). The utility of the plasma membrane is absolutely necessary to ensure survival and success in fertilizing the egg . In addition to protecting the cell organelles

from mechanical damage, the plasma membrane also plays an important role as a good filter for the exchange of intra- and extracellular substances maintained in metabolic processes (10). The destruction of the plasma membrane results in disruption of metabolic processes and physiological processes, resulting in the death of spermatozoa (20).

Some researchers prove that antioxidants from the plant can improve the quality of spermatozoa in a diluent when freezing. In our study, at 0.1 mg green tea extract / 100 cc diluent, the optimal response toward sperm motility, viability and membrane integrity was observed. Likewise, in Sahiwal bull, the maximum response of green tea extract was evident at 0.5% concentration in diluent semen (14).

According to research (1), proves that green tea extract can act as an antioxidant against canine, avian and mouse spermatozoa. Meanwhile, according to (15), proves that the addition of green tea extract of 0.75% in eeg yolk citrate diluents provides the best post-thawing quality (motility, viability and integrity of membranes). This is because green tea extract acts as an antioxidant containing polyphenols which can inhibit peroxidase reactions so that free radicals are not formed. An important substance catechin contained in green tea extract can inhibit ROS. Catechin can prevent and fight free radicals in cell membranes so that cell death can be prevented, cell membranes are not damaged and its function to regulate the outflow of substrate and electrolyte is maintained (6). In this study the quality of spermatozoa with the addition of green tea extract dose 0.05 mg and 0.15 mg / 100 cc diluent lower than the addition of 0.1 mg dose. This is because it is thought to be due to a decrease in pH diluent so it is no longer appropriate with the physiological condition of spermatozoa. Decreased pH in the cell environment will cause problems with the work of metabolic enzymes (17).

5. Conclusion

The addition of green tea extract in milk-egg yolk diluent could be maintain progresif motility, viability and integritas membrane of Simental bull's sperm on cold temperature, with the best dose was 0.1 mg/100 cc diluent.

References

- (1). Abshenas, J., Babaei, H., Zare, M.h., Allahbakhshi, A and Sharififar, F. 2012. The effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal headt strees. *Vet.Res.For.*2:242-247.
- (2). Agarwal, A., Ikemoto, L and Loughlin, K.R. 2003. Relationship of sperm parameter to level of Reactive Oxygen Species I semen Specimen. *Urol.*152 : 107-110
- (3). Agarwal, A., Makker k and Sharma R. 2008. Clinical relevance of oxidative strees in male factor infertility : an update. *American Journal of Reproductive Immunology.* 59 (1): 2-11.
- (4). Al-Daraji, H.J. 2011. Effect of diluents supplementation with different levels of green tea on roosters' semen quality during in vitro storage. *Int.j.Pl. Anim. Environ.Sci.*3: 51-56.
- (5). Alvarez, J.G and Storey, B.T. 1995. Differential incorporation of fatty acid into and peroxidative loss of fatty acid from phospholipid of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-345.
- (6). Armoskaite, V., Ramanauskiene, K., Maruska, A., Razukas, A., Dagilyte, A., Baranauskas, A and Breidis, V. 2011. The analisys of quality and antioxidant activity of green tea extracts. *J. Med.Plant Res* 5: 811-816.
- (7). Aslam, H.A., Dasrul., Rosmaidar. 2014. Pengaruh penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed terhadap persentase motilitas dan membrane plasma utuh spermatozoa sapi Aceh setelah pembekuan. *Medika Veterinaria.* 8 (1): 20-26.
- (8). Bucak, M.N., Sariozkan S., Tuncer P.B. 2010." The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities," *Small Ruminant Research.* 89(1):24-30.
- (9). Bucak, M.N., Baspinar, N., Tuncer, P.B., Coyan, K., Sanozakan, S., Akalin, P.P., Buyukleblebici, S and Kucukgunay, S. 2011. Effect of curcumin and dithioerythriol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia.* 44(Suppl.1): 102-109.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01146.x>
- (10). Garner and Hafez, E.S.E, 2000. *Reproduction in Farm Animal.* 7th Edition. Philadelphia. Baltimore. New York London.

- (11). Gohar A, Khan H, Yousaf MS, Ahmad J, Ali Q, Khan M, Khan D, Hayat Y, Ali F, Ahmad I, Saleem M and Ullah F. 2014. Assessment of alpha lipoic acid inclusion in semen extender on cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Life Sci. J* 11: 45-50.
- (12). Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in biology and medicine*. Third Edition Oxford : Oxford university Press : 1-35, 246-350, 664-667.
- (13). Ibrahim, A.H.B., Ahmed, R.H. and Ahmed, M.R. 2014. Antioxidant effect of green tea leaves extract on in vitro production of sheep embryos. *Pakistan J. Zool.* 46:167-175.
- (14). Jirina, K and Anton, K. 2013. Effect of green tea extract on motility parameters of rabbit sperm. *J. Microbiol. Biotech. Fd.Sci.* 2:1-13. http://www.jmbfs.org/section_animal_physiology/?issue_id=2422&article-id=10
- (15). Khan, H., Khan, M., Qureshi, MS., Ahmad, S., Ullah, A.G.H., Ullah, F., Hussain, A., Khatri, P., Shah, S.S.A., Rehman, H and Khan, A. 2017. Effect of green tea extract (*Camellia sinensis*) on fertility indicators of post-thawed bull spermatozoa. *Pakistan J. Zool* 49(4): 1243-1249.
- (16). Lamirande, E.A.H., Jiang, H., Kodana, H and Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2(1): 48-54
- (17). Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid I (Terjemahan Maggy Thenawidjaya) Erlangga. Jakarta.
- (18). Purdy PH 2006. A Review on Goat Sperm Cryopreservation. *Small Rumin Res.* 63: 215-225.
- (19). Ramu S and Jeyendran RS. 2013. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol Biol.* 2013: 927:21-5.
- (20). Rasul, Z., Ahmad, N and Nazar, M. 2001. Changes in motion characteristic, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Biol. Reprod.* 65:217-224.
- (21). Sikka, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience.* (1): e78-e86.
- (22). Steel, R.G.D dan Torrie, G. 1990. *Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- (23). Suryohudoyo, P. 2000. *Ilmu Kedokteran Hewan*. Cetakan Pertama. Jakarta. CV. Sagung Seto. 31-47.
- (24). Susilowati, S dan Hernawati, T. 2013. Protein Plasma Seminalis Dan Pembekuan Semen Kambing Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- (25). Toelihere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa Bandung.
- (26). Valko, M., Morris, H and Cronin, M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry.* 12 (10); 1161-1208.

(27). Yanagimachi. 1994. Mammalian Fertilization. In : The Physiology of Reproduction. E. Knobil, J. Neil, L.L. Greenwald, C.L. Market, D.W. Plaff. Raven Pers LTD. New York.



The Committee of
The 2nd Veterinary Medicine International Conference 2018
in Collaboration with ADPRC-OHCC

Certify

Trilas Sardjito

As Poster Presenter

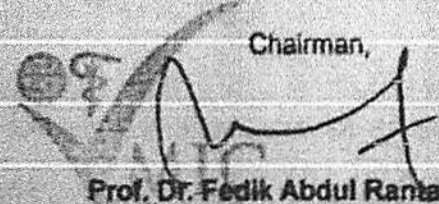
In The International Conference
"New Wave Bio-X Veterinary Medicine"
"Strengthen on One Health, Biomedical, Reproduction,
Nutrition and Clinical Science"

Surabaya, July 4th - 5th 2018

Dean
Faculty of Veterinary Medicine
Airlangga


Prof. Dr. Tri Las Sardjito, M.Med., DVM

Chairman,


Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, DVM

Registration Fee: 75 ; Speaker, oral presenters/presentation posters=100

The Effect of Green Tea Extract Supplementation in Semen Extender on Post Thawing Sperm Quality of Simmental Bull

SuherniSusilowati¹⁾, TriilasSardjito¹⁾, OkySetyoWidodo²⁾,
RochmahKurnijasanti³⁾, Wurlina¹⁾, Erma Safitri¹⁾, and Imam Mustofa^{1*)}

¹⁾ Department of Veterinary Reproduction, ²⁾ Department of Animal Husbandry,

³⁾ Department of Basic Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine,

UniversitasAirlangga. Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya-60115

Tel. +62-031-5992377, Fax. +62-031-5993015,

^{*)}Corresponding author: imam.mustofa@fkh.unair.ac.id

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of green tea extract as antioxidant in the extender of frozen semen on viability, motility, intact of plasma membrane, percentage of necrosis and apoptosis of spermatozoa. Ejaculate collected from four Simmental Bull, evaluated and placed at 37°C water bath before freezing process. The semen samples diluted with milk-egg yolk supplemented with green tea extract of 0 (as control), 0.05, 0.1, and 0.15 mg/100 mL extender respectively. Diluted semen packed in 0,25 mL straws were placed at cooltop to make sure the temperature decrease from room temperature to 5°C, then frozen and stored in liquid nitrogen for four weeks. Frozen straws were thawed individually in 37°C water bath for 30 s then microscopic evaluation. The result showed that post-thawed sperm viability, motility, and intact plasma membrane of frozen semen in extender supplemented with 0,1 mg green tea extract/ 100 mL were highest ($p<0,05$), meanwhile the percentage of necrosis and apoptosis of sperm were lowest ($p<0,05$) compared to the other groups. It could be concluded that a dose of green tea extract in frozen semen extender was potentially act as antioxidant to reduce decreased quality of post thawed sperm.

Keywords: green tea extract, post-thawed sperm quality, necrosis, apoptosis

Introduction

Genetic improvement is a key in any modern cattle breeding system. One way to achieve genetic improvement is to use the cryopreserved semen of superior commercial sires (1). The effects of cryopreservation on sperm function and fertility have been widely studied. Techniques for the successful cryopreservation of spermatozoa have progressed and are now standardized (2). Although frozen semen has advantages which can be used for a long time, but it has weakness that will cause decreasing in quality after freezing process. It is about

50% of spermatozoa will die during freezing process and spermatozoa that survive generally have low fertility (3). During the process of freezing and thawing, the spermatozoa passing through a variety of temperature changes and extreme osmolarity that could be trigger the production of reactive oxygen species (ROS) (4, 5). Thus, cryopreservation of spermatozoa also have a detrimental effects on sperm quality after thawing (6). During cryopreservation, semen is exposed to cold shock and atmospheric oxygen, this will raise up the level of lipid peroxidation (7). Production of reactive oxygen species (ROS) in cryopreservation has been associated with deterioration of sperm motility, viability and intact plasma membrane of bull semen (8) and promote DNA fragmentation of spermatozoa(9). Experiments have shown that oxidative stress produced in these procedures due to high reactive oxygen species (ROS) associated with low quality of seminal plasma(10).

Lipid peroxidation during the semen freezing process will damage the spermatozoa, caused of plasma membrane of spermatozoa composed of phospholipid. It contains unsaturated fatty acids which particularly susceptible to free radicals that it will stimulate the autocatalytic reactions and caused damage at the double bonds (11). Lipid peroxidation may alter the structure of plasma membrane, the region of spermatozoa acrosome and cause the loss of motility. Prolonged lipid peroxidation may damage the structure of the lipid matrix which will cause an unstable cell plasma membrane (12).

ROS plays a role in the regulation of spermatozoa function physiologically. ROS affect post ejaculated spermatozoa motility initiation through cAMP synthesis and protein phosphorylation(9). Superoxide anion at physiologic concentrations is required for initiation of hyper-activation, capacitation and acrosomic reactions during fertilization (13, 14). Other studies have suggested that low concentrations of free radicals in human semen increase the ability of spermatozoa to bind the zonapelucida(15). The concentration of antioxidant and storage periods have significant effects on motility, viability, acrosome integrity and

membrane integrity (12). Means anti-oxidants prevent the increase of free radicals and improve the quality of semen (16).

Green tea extract is one of the plant derived antioxidant. Several studies documented that herbs antioxidant in freezing extender were associated with improvement of spermatozoa quality (17). Recently, plant-derived antioxidants have been getting major focus due to their lower cytotoxicity and are considered to be better than synthetic antioxidants (18). Green tea has valuable effects on health due to abundant amount of polyphenols that are the major water soluble components of green tea infusions (19). In addition, green tea polyphenol (GTP) are potent decrease of ROS (20). One of result from tea leaves (*Camellia sinensis*) processing is green tea which has strong antioxidant activity. Green tea extract contains high concentration of liquid polyphenol (21). The main polyphenols in green tea were epikatechin, (EC), epigallocatechin (EGC), epikatechingalat (ECG) and epigallocatechingalat (EGCG) (22). Based on those, it is necessary to determine the effect supplementation of green tea extract as antioxidants in the freezing process of semen.

Material and Methods

This research was conducted at Regional Artificial Insemination Center, in Teaching Farm Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, located at Driyo Rejo District, Gresik Residence, East Java, Indonesia. Four head of 3-5 years old and weighed 400-900 kg fertile Simmental bulls were used for this study. Semen was collected from the bulls twice a week by using artificial vagina. Fresh semen was assessed macroscopically (volume, odor, pH, consistence, color) and microscopically (motility, viability and concentration). If spermatozoa motility and viability more than 70%, it means semen was qualify for the study. Ejaculate was processed to be frozen semen according The Indonesian National Standard number SNI: 4869-1:2017 (production and analysis of frozen semen) of The National Standardization Agency of Indonesia.

Processing of semen

Milk-egg yolk extender contain penicillin (1000 IU/ mL), streptomycin (1 mg/mL), 7% glycerol and distilled water until 100 mL, divided into four groups, i.e. control group and three treatment groups supplemented with 0.05 (P1), 0.1 (P2), and 0.15 mg/100 mL extender (P3) respectively. Fresh semen was diluted in extender to obtained 30×10^6 spermatozoa /mL.

Each diluted semen from each groups was equilibrated at 5°C for 2 h before filled in 0.25mLstraws. The straws were placed on steel racks and held in liquid nitrogen at minus 140°C for 10 minutes. Frozen straws were then immediately immersed in liquid nitrogen (minus 196°C) and stored for 4 weeks until further assessment. Post thawed semen analysis was conducted on two sample of straws from each treatment, it were thawed at 37°C for 30s to determined the semen quality parameters with six replication respectively.

Green tea extract preparation

Green tea leaves was dried, milled with a grinding machine, and then soaked with 96% ethanol solvent and allowed to stand for 3 days, covered with aluminum foil to prevent evaporation. Furthermore, the green tea solution was squeezed by using filter paper, and then the filtrat was evaporated at 50°C at 45 rpm speed of rotator to separate the solvent with extract green tea leaves to obtain thickened extract. The extract was evaporated in acid chamber until formed solid extract and then freeze dried.

Semen Evaluation

Sperm motility

Progressive motility was assessed using a phase contrast microscope (200 x magnification) at 37°C temperature. A wet mount was made by using a 10 µL drop of semen

placed directly on a microscope slide and covered with cover glass(23). Sperm motility was counted on three microscopic fields for each semen sample and then averaged.

Sperm viability

Eosin negrosin staining was used to evaluate the viability (live/dead in %) of semen. One drop of semen was placed on a object glass slide and this sample mixed with one drop of eosin-negrosin solution. The mixture was smeared on the glass slide and allowed to dry. One hundred spermatozoa were evaluated in at least five different fields in each smear under a light microscope. Observed and recorded the unstained heads as live of spermatozoa and/or stained/partial stained heads of as dead spermatozoa (23).

Sperm plasma membrane integrity

Hypo-osmotic swelling test (HOS) was used to evaluate plasma membrane integrity (24). One mL of hypo-osmotic solution (7.35 grams of Na Citrate, 13.52 grams of fructose was dissolved in 1000 mL of aquadest) plus 0.1 mL of spermatozoa then incubated at room temperature for 30 minutes. Following by incubation, 15 μ l of the sample was placed on a object glass slide, covered with a cover glass and observed with a 400x magnification microscope. Spermatozoa with intact plasma membrane are characterized by a circular spermatozoa tail because the plasma membrane of spermatozoa still works well in water absorption in a hypotonic environment. Meanwhile damaged spermatozoa membrane marked by a straight tail (25).

Sperm necrosis

One drop of semen was smeared on the object glass, fixed in solution of glacial acid and methanol absolute (1: 3) for 15 minutes, and finally stained with Hematoxylin Eosin. Necrotic spermatozoa characterized by pycnotic, karyorrhexis, and karyolysis of nuclei(26).

Examination conducted on five different fields of view at 400 magnification per 100 spermatozoa under phase-contrast microscope (Olympus BX51 TF, Japan).

Spermapoptosis

Acridin Orange Staining was used to determine apoptosis of spermatozoa. One drop of semen smeared on the object glass, and dried at room temperature. The smear preparations were fixed in solution of glacial acid and methanol absolute (1: 3) for 15 minutes, dried again at room temperature, dripped with acridin orange, and then covered with a cover glass. Observation conducted under a fluorescence microscope with magnification 100 times per 100 spermatozoa. Apoptotic spermatozoa were yellow - red, while the live spermatozoa were greenish color(27).

Result

In this study the fresh semen of Simmental bull was performed macroscopic and microscopic evaluation first. The macroscopic evaluation were examination of volume, color, odor, consistency and degree of acidity (pH), while microscopic evaluation were examination of mass movement, individual movement, concentration and viability of spermatozoa (Table 1).

Table 1. The characteristic of Simmental bull semen

Parameter	Mean \pm SD
Volume (mL)	7.26 \pm 1.72
Consistence	Medium to thick
Color	Milky white to yellowish
Odor	Spesific
pH	6-7
Mass Movement	+++
Motility (%)/ speed	85.83 \pm 2.89/3
Viability (%)	95.65 \pm 2.36
Abnormality (%)	6.69 \pm 1.86
Concentration (millions/mL)	1040 \pm 226.55

Functional assay of spermatozoa at pre-frozen and post-thawed semen showed that supplementation of 0.1 mg/ 100 ml green tea extract in milk-egg yolk semen extender was have highest ($p<0.05$) of viability, motility and plasma membrane integrity (Table 2), and lowest ($p<0.05$) of necrotic and apoptotic of spermatozoa compared to other group (Table 3).

Table 2. Viability, motility and intact membrane integrity of pre-frozen and post-thawed spermatozoa of Simmental bull semen diluted in milk-egg yolk extender. P0: control, P1, P2, and P3 supplemented with green tea extract: 0.05, 0.10, and 0.15 mg/100 mL extender.

Treatment	Viability		Motility		Intact Membrane Integrity	
	Pre-Frozen	Post-thawed	Pre-Frozen	Post-thawed	Pre-Frozen	Post-thawed
P0	64.25±2.05 ^c	58.15±1.25 ^c	60.25±2.35 ^c	55.45±1.25 ^c	56.25±2.05 ^c	46.15±1.25 ^c
P1	68.20±1.70 ^b	58.35±1.15 ^b	65.20±1.70 ^b	58.35±1.10 ^b	62.20±1.70 ^b	50.35±1.15 ^b
P2	77.50±2.35 ^a	68.25±1.10 ^a	75.50±2.50 ^a	64.35±1.20 ^a	72.25±2.15 ^a	62.25±1.15 ^a
P3	68.55±2.20 ^b	59.15±1.20 ^b	66.55±2.40 ^b	58.15±1.30 ^a	63.35±2.20 ^b	48.15±1.20 ^b

Different superscript in the same column were significantly different ($p<0.05$).

Table 3. Necrosis and apoptosis of pre-frozen and post-thawed spermatozoa of Simmental bull semen diluted in milk-egg yolk extender. P0: control, P1, P2, and P3 supplemented with green tea extract: 0.05, 0.10, and 0.15 mg/100 mL extender respectively.

Treatment	Necrosis		Apoptosis	
	Pre-frozen	Post-thawed	Pre-frozen	Post-thawed
P0	5.25±2.05 ^c	7.15± 1.15 ^c	8.15 ^c ±2.05 ^c	9.15±1.25 ^c
P1	3.20±1.70 ^b	6.35±1.25 ^b	4.20±1.70 ^b	7.35±1.30 ^b
P2	2.25±0.15 ^a	3.05± 1.15 ^a	3.25±0.15 ^a	4.05±1.15 ^a
P3	4.35±2.20 ^b	5.15±1.20 ^b	5.25±2.20 ^b	7.05±1.25 ^b

Different superscript in the same column were significantly different ($p<0.05$).

Discussion

The fresh semen of Simmental bulls in this study had been qualified to be processed into frozen semen (Table 1). The motility of spermatozoa is one of the criteria of semen quality that correlates with the ability of spermatozoa to fertilize the ovum. The motility of

spermatozoa may occur due to the energy (Adenosine Triphosphate) produced by the mitochondria and due to the dynein motor (cytoskeleton) for flagella where motion is regulated by Ca^{2+} and cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) (28).

Spermatozoa absolutely requires intact of plasma membrane integrity for survival. Plasma membrane is the entrance of substances from outer to inner of the cell, or vice versa. If the plasma membrane of spermatozoa is damaged, it caused metabolism will be disrupted, resulted decreased motility and ability of spermatozoa to fertilize the egg (29).

Cryopreservation process lead to damage mainly caused by the cold shock, intracellular ice crystal formation, oxidative stress, and reorganization of lipid and protein of the plasma membrane(10). Cryopreservation can damage spermatozoa cell compartment such as membranes (plasma and acrosome), mitochondria and even chromatin damages (30). This is because during the process of freezing and thawing of spermatozoa, it goes through a variety of temperature changes and extreme osmolality which trigger the production of reactive oxygen species (ROS) (4, 5). Stress on the plasma membrane during freezing of spermatozoa lead to asymmetric changes in the phospholipid bilayer membrane (31). The plasma membrane of mammalian spermatozoa is rich in polyunsaturated fatty acids that are easily damaged by Reactive Oxygen Species (ROS), in a reaction called lipid peroxidation (32).

There are biological antioxidants such as GSH, glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase (SOD) in semen, that have important roles as suppressors of free radicals (33). Endogenous antioxidant capacity of spermatozoa may disrupted during freezing and thawing process. If the balance between Reactive Oxygen Species (ROS) and antioxidants is disturbed, oxidative stress may result in negative effects on DNA integrity (9), inhibition of oxidative metabolism (34) and decrease motility and viability of spermatozoa (7).

The results of this study showed that supplementation of green tea extract in milk-egg yolk semen extender could maintain motility, viability, intact plasma membrane and decrease the necrosis and apoptosis of Simmental bull spermatozoa. The best dose was 0.1 mg / 100 mL extender. It was because green tea extract has antioxidant properties that contain polyphenols that could inhibit the peroxidation reaction so that free radicals were not formed. The existence of active substances, catechin in green tea extract then ROS could be suppressed. The catechin compound could overcome the presence of superoxide, hydroxyl radicals, peroxy radicals and free radicals. Catechin was able to prevent and attacks oxidative radicals on the cell membrane so that cell death could be prevented, cell membranes were not damaged and can function in regulate inflow and outflow of substrate and electrolyte needed in metabolic processes. The hydroxyl group of catechin compounds acts as an antioxidant capable of reducing the production of ROS(35).

Conclusion

The supplementation of green tea extract in milk-egg yolk semen extender could be maintain motility, viability and plasma membrane integrity and decrease necrosis and apoptosis of post-thawed Simmental bull spermatozoa, with the best dose was 0.1 mg / 100 mL of semen extender.

Acknowledgements

This research was supported by funding from the Research, Technology and Higher Education Ministry (RISTEK-DIKTI). The authors are also grateful to all of the laboratory staff in the Department of Veterinary Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga.

References

1. Biscarini F, Nicolazzi EL, Alessandra Stella A, Boettcher PJ and Gandini G. 2015. Challenges and opportunities in genetic improvement of local livestock breeds. *Frontiers in genetic* 6: 1-7.
2. Barik M, Bajpai M, Patnaik S, Mishra P, Behera P, and Dwivedi SN. 2016. Development of new method and protocol for cryopreservation related to embryo and oocytes freezing in terms of fertilization rate: A comparative study including review of literature. *Adv. Biomed Res.* 5: 117.
3. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, and Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of bull sperm surface protein p 25. *J. Androl.* 21 :700-707.
4. Nebel RL. 2007. Techniques for artificial insemination of cattle with frozen thawed semen. In: *Current therapy in large animal. Theriogenol.* 2nd.ed. Saunders Elsevier Missouri.
5. Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasmamembrane improves cryosurvival. *Cryobiol.* 51 : 241-249.
6. Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, and Martinez EA. 2012. Detrimental Effects of Non-Functional Spermatozoa on the Freezability of Functional Spermatozoa from Boar Ejaculate. *PLOS ONE* 7(5): e36550.
7. Agarwal A, Virk G, Ong C, and du Plessis SS. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health* 32(1): 1–17.
8. Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Andrabi SMH and Akhter S. 2011. Glutathione addition in tris-egg yolk extender improves the quality of cooled buffalo (*bubalus bubalis*) bull semen. *Pakistan J. Zool.* 43 (1):49-55.
9. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ and Meyers. S.A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* 24:621-628.
10. Bailey JL, Bilodeau JF, and Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals : A damaging and capacitation phenomenon. *J. Androl*, 21:1-7.
11. Catalá A. 2013. Five decades with polyunsaturated fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects. *J. Lipids* 2013: 1-19.
12. Itri R, Junqueira HC, Mertins O, and Baptista MS. 2014. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids *Biophys Rev*: 6:47–61.
13. Ogbuewu IP, Aladi NO, Etuk IF, Opara MN, Uchegbu MC, Okoli IC and Iloeje MU, 2010. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci* 3: 138-164.
14. Thompson A, Agarwal A, and Du Plessis SS. 2014. Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: a review. In: *Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers.* S.J. Parekattil and A. Agarwal (Eds.). Springer Science+Business Media New York.

15. Kumar S and Das GK. 2005. Frozen sperm quality with reference to reactive oxygen species ; a review. *Indian. J. Anim.Sci.* 75 : 874-884.
16. Ahmadi S, BashiriR, Ghadiri-AnariA, Nadjarzadeh A. 2016. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J ReprodBioMed* 14 (12): 729-736.
17. Khan H, Khan M, Qureshi MS, Ahmad S, Ullah AGH, Ullah F, Hussain A, Khatri P, Shah SSA, Rehman H and Khan A. 2017. Effec of green tea extract (*Camellia sinensis*) on fertility indicators of post –thawed bull spermatozoa. *Pakistan J. Zool* 49(4): 1243-1249.
18. Ibrahim AHB, Ahmed RH and Ahmed MR. 2014. Antioxidant effect of green tea leavesextract on in vitro production of sheep embryos. *Pakistan J. Zool.* 46:167-175.
19. Lee LS, Kim SH, Kim YB and Kim YC. 2014. Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. *Molecules* 19: 9173-9186.
20. Roy M, Chakrabarty S, Sinha D, Bhattacharya RK and Siddiqi M. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechingallate : a green tea polyphenol. *Mutat.Res.*, 523: 33-41.
21. Senanayake SPJN. 2013. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review. *J. Functional Foods.* 5:1529-1541
22. Du GJ, Zhang Z, Wen XD, Yu C, Calway T, Yuan CS, Wang CZ. 2012. Epigallocatechingallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients.* 4(11):1679-91.
23. Asia PD, Susilowati S, Bijanti R, Madyawati SP, Hernawati T, Restiadi TI. 2017. The effect of addition of seminal plasma Simmental bull on motility and viability of fat tailed sheep spermatozoa after equilibration in freezing process. *Ovozoa* 6 (1): 50 – 54.
24. Gohar A, Khan H, Yousaf MS, Ahmad J, Ali Q, Khan M, Khan D, Hayat Y, Ali F, Ahmad I, Saleem M and Ullah F. 2014. Assessment of alpha lipoic acid inclusion in semen extender on cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Life Sci. J* 11: 45-50.
25. Ramu Sand Jeyendran RS. 2013. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol Biol.* 2013: 927:21-5.
26. Mulyati S, Darmasasmita DE, and Arimbi. 2016. The effect of thawing length on the motility and necrosis of spermatozoa Simmental bull. *Ovozoa* 5 (1): 13 – 20.
27. Ortega-Ferrusola C, Anel-López L, Martín-Muñoz P, Ortiz-Rodríguez JM, Gil MC, Alvarez M, de Paz P, Ezquerro LJ, Masot AJ, Redondo E, Anel L and Peña FJ. 2017. omputational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermtosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction* 153 293–304.
28. Pereira R, Sá R, Barros A, and Sousa M. 2017. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 19(1):5-14.
29. Garner DL and Hafez ESE 2016. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B and Hafez ESE (Eds). *Reproduction in farm animal.* 7thEdition. Philadelphia. Baltimore. New York London.

30. Castro LS, Hamilton TRS, Mendes CM, Nichi M, Barnabe VH and Visintin JA. 2016. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *J. Anim. Sci and Biotechnol* 7:17-25.
31. Agarwal A, Ramadan, A Mohamed AB. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79:829-843
32. Goolsby HA, Simoni G, Simoni J, and Prien D. 2014. Lipid peroxidation during the cryopreservation process of porcine spermatozoa. *Global J. Med. Res: E Gynecology and Obstetrics* 14: 29-35.
33. Petruska P, Capcarova M, Sutovsky P. 2014. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species . *Turk J Vet AnimSci* 38: 643-652.
34. Makker K, Agarwal, A and Sharma R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129: 357-367.
35. Armoskaite V, Ramanauskiene K, Maruska A, Razukas A, Dagilyte A, Baranauskas A and Breidis V. 2011. The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts. *J. Med. Plant Res* 5: 811-816.

NAMA : Trilas Sardjito
PT : Universitas Airlangga
HP : 087852047371

DESKRIPSI

EKSTRAK TEH HIJAU DALAM PEMBEKUAN SEMEN SAPI SIMENTAL

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan penambahan ekstrak the hijau dalam pembekuan semen sapi Simental. Penambahan ekstrak the hijau dilakukan pada media pengencer pada temperature kamar. Ekstrak the hijau berfungsi sebagai antioksidan dan melindungi membrane spermatozoa terhadap cekaman dingin. Media pembekuan semen sapi tersebut dapat meningkatkan kualitas semen beku sapi Simental posthawing sehingga bila digunakan untuk kawin suntik akan menghasilkan angka kebuntingan yang tigggi.

Latar Belakang Invensi

Berbagai teknologi telah diciptakan dan dipergunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak. Inseminasi buatan (kawin suntik) merupakan awal pemakaian bioteknologi reproduksi pada hewan jantan. Teknologi kawin suntik telah lama berkembang di Indonesia terutama pada ternak besar (sapi potong dan sapi perah), tetapi sampai saat ini masih ada kendala kualitas semen sapi posthawing. Salah satu faktor pendukung dalam upaya mengoptimalkan program inseminasi buatan (kawin suntik) pada ternak sapi adalah tersedianya *frozen semen* (semen beku) yang memenuhi standar minimal.

Proses pembekuan menyebabkan kerusakan fungsi maupun struktur membrane dan kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan hidup. Tujuan dari proses pembekuan adalah mempertahankan sesempurna mungkin beberapa sifat dari materi biologis terutama

viabilitasnya Kendala utama dari proses pembekuan ini adalah terjadinya kerusakan sel. Penyebabnya antara lain karena proses dehidrasi tidak terjadi sehingga terbentuk kristal-kristal es intraseluler yang dapat merusak sel. Selain itu juga dapat karena peningkatan osmolaritas media pembekuan sehingga krioprotektan bersifat racun selanjutnya terjadi kerusakan fisik yaitu terbentuknya Kristal es ekstraseluler, toksisitas dari elektrolit yang pekat atau terjadinya osmotic swelling. Kerusakan selama pembekuan bisa terjadi pada membrane plasma maupun pada inti spermatozoa. Pada proses pembekuan, membrane lipid spermatozoa mudah terinduksi sehingga terjadi Lipid Peroxidation (LPO). Kerentanan suhu dingin dikaitkan dengan rasio asam lemak tak jenuh yang tinggi dari pada lemak jenuh sehingga Reactive Oxygen Species yang terbentuk juga tinggi.

Teh hijau dapat bertindak sebagai antioksidan karena mengandung bahan aktif yaitu polyphenolic, catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechingallate dan apigallocatechin-3 gallate. Ekstrak teh hijau juga dilaporkan mempunyai keuntungan terhadap kualitas spermatozoa kucing yang disimpan pada suhu dingin dengan waktu yang panjang dan juga mencegah oksidasi pada spermatozoa babi pada proses pembekuan .

Sesuai dengan invensi ini disediakan suatu komposisi bahan untuk media pembekuan semen sapi Simental yaitu ditambahkan ekstrak the hijau. Komposisi media pembekuan sesuai invensi ini terdiri dari kuning telur sitar, gliserol dan ekstrak the hijau 1mg/ 100 ml bahan pengencer. Sedangkan langkah langkah pembekuan semen sapi adalah : penampungan semen sapi, pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis , apabila motilitas dan viabilitasnya \geq 70% maka ditambah dengan ekstrak the hijau pada suhu 37° C lalu diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya dicampur dengan pengencer susu kuning telur, dilakukan pendinginan pada suhu 5°C ditambah gliserol, filling dan sealing straw kemudian preefreezing dan dilanjutkan freezing. Produk semen beku yang dihasilkan dari komposisi dan metode pembuatan sesuai invensi ini memiliki persentase hidup, motilitas individu progresif,

membrane plasma utuh, nekrosis dan fragmentasi DNA (apoptosis) yaitu 69,17 %; 70,67%; 69,33%, 2,17 dan 2,00 %.

Uraian Lengkap

Segera setelah semen ditampung dinyatakan memenuhi syarat dengan melalui serangkaian pemeriksaan , maka dilanjutkan dengan pengenceran yang memenuhi syarat. Syarat bahan pengencer tersebut adalah ; mengandung nutrisi, bersifat buffer, bersifat isotonis, mempunyai efek antibakteri, tidak beracun dan dapat melindungi spermatozoa pada proses pendinginan, pembekuan dan thawing. Selain itu pengenceran juga bertujuan untuk memperbanyak volume dan memperpanjang lama hidup spermatozoa. Semen perlu diencerkan karena bila tidak ditambah bahan pengencer walaupun disimpan pada suhu dingin akan cepat mati, hal tersebut karena spermatozoa bergerak aktif (metabolism terjadi terus) sehingga cadangan energy akan habis dan efek sampingnya kadar asam laktat meningkat. Setelah diencerkan, semen dibekukan dengan tujuan dapat disimpan antara 10-12 tahun dengan kondisi kualitas semen masih dipertahankan. Tetapi sampai saat ini kualitas semen beku sapi posthawing masih berkisar 40% sehingga keberhasilan kawin suntik juga masih rendah yang disebabkan banyak metode untuk thawing semen beku sapi.

Melihat fenomena diatas perlu kiranya diusahakan bahwa semen sapi yang dibekukan harus mempunyai kualitas yang memuaskan. Sehingga sampai saat ini masih banyak penelitian bahan apakah yang baik untuk ditambahkan didalam bahan pengencer sehingga kualitas semen beku sapi Simental akan meningkat.

Teh hijau diproduksi dari perebusan daun teh segar pada temperatur tinggi sehingga enzim pengoksidanya tidak aktif dan kandungan polifenolnya tetap ada. Komponen teh terdiri dari polifenol termasuk katekin, kafein, asam amino, vitamin, polisakarida dan florin. Katekin yang terkandung pada setiap 100 gram daun teh adalah sebesar 16-30%. Katekin juga disebut

asam katekoat dengan rumus kimia $C^{15}H^{14}O^6$. Teh hijau mengandung senyawa antioksidan yang disebut Epigallocatechin gallate (EGCG). EGCG merupakan golongan katekin yang paling dominan pada teh hijau dan memiliki aktifitas antioksidatif yang sangat kuat. Stabilitas katekin dipengaruhi oleh pH dan suhu. Apabila pH dan suhu semakin tinggi maka semakin menurun kandungan katekinnya.

Semen beku adalah semen hasil penampungan dengan menggunakan vagina buatan , mempunyai konsentrasi, motilitas dan viabilitas yang memenuhi syarat, selanjutnya ditambah dengan bahan pengencer yang dibuat menurut standart operasional dibalai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Akhirnya dilakukan pembekuan sampai dibawah titik beku yaitu antara $-79^{\circ}C$ sampai $196^{\circ}C$. Tujuan pembekuan adalah untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Pembekuan merupakan proses penghentian sementara metabolisme sel tanpa mematikan fungsi sel, tanpa mematikan fungsi sel tetapi metabolisme dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Pembekuan merupakan suatu fenomena pengeringan fisik, dimana pada pembekuan tersebut terbentuk kristal – kristal es, penumpukan elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel. Kristal es intraseluler dapat merusak spermatozoa secara mekanik. Penumpukan konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding spermatozoa. Sedangkan thawing semen beku akan menyebabkan perubahan permeabilitas membrane spermatozoa yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. Pada proses penyimpanan suhu rendah akan terjadi cold shock yang akan menyebabkan terjadinya perubahan susunan lipid membran dan fluiditas membran akhirnya terjadi pelepasan komponen fosfolipid dan kolesterol serta hilangnya beberapa proteinase akrosin yang menyebabkan hilangnya integritas membran. Selama penyimpanan pada suhu dingin akan terbentuk Reactive Oxygen Species (ROS) yang akan menyebabkan oksidasi baik lipid maupun protein membran sehingga integritas membran spermatozoa terganggu. Perubahan integritas membran akan menyebabkan pemasukan sodium dan

kalsium ke dalam sel serta pemasukan oksigen juga menurun akibatnya aktivitas metabolik dan motilitas akan menurun.

Kondisi spermatozoa akibat pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria serta komponen penyusun bagian lainnya. Misal sitoskeleton. Lemahnya ikatan kovalen akan diikuti dengan putusnya ikatan tersebut apabila paparan suhu rendah terus berlangsung. Hal tersebut akan menyebabkan perubahan struktur komponen membran spermatozoa, sehingga menyebabkan kemunduran fungsi dari masing-masing komponen. Terjadinya destabilisasi membran plasma yang akan menyebabkan peningkatan permeabilitas sel terhadap ion ekstraseluler termasuk ion Ca^{2+} yang akhirnya menyebabkan kematian sel.

Teh hijau dapat mengurangi produksi ROS dengan melengkapi elektron yang tidak berpasangan sehingga mengurangi kerusakan protein, membran lipid dan asam nukleat. Katekin dapat mencegah dan melawan radikal bebas pada membran sel sehingga sel tidak mati, sel tidak rusak dan berfungsi kembali untuk proses metabolisme. Kelompok hydroxyl dari katekin bertindak sebagai antioksidan yang dapat menurunkan produksi ROS. Selain itu teh hijau mengandung vitamin C dan vitamin E yang juga bersifat antioksidan.

Perbedaan yang jelas dibandingkan dengan media pembekuan yang ada sekarang yaitu ekstrak teh hijau yang penambahannya saat awal penambahan media pembekuan pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 5 menit. Sebagaimana dijelaskan diawal yang menunjukkan tentang cara penambahan ekstrak teh hijau dalam media pembekuan semen sapi Simental yaitu susu kuning telur dilakukan sebelum pendinginan. Kadar ekstrak teh hijau yang ditambahkan adalah 1 mg/ 100 ml bahan pengencer.

Klaim

1. Komposisi media pembekuan semen sapi Simentalyang terdiri dari susu kuning telur, gliserol dan ekstrak teh hijau yang digunakan untuk meningkatkan fungsi media pembekuan sehingga bila digunakan untuk proses kawin suntik dapat menghasilkan fertilissai yang maksimal akhirnya angka kebuntingan meningkat.

2. Suatu komposisi media pembekuan semen sapi Simental sesuai dengan klaim 1 , dimana persentase masing-masing bahan adalah susu kuning telur dengan perbandingan 1:20, gliserol 10 % danekstrak teh hijau 1 mg/100 ml bahan pengencer.

3. Suatu komposisi media pembekuan semen sapi Simental sesuai klaim 1 dan 2 dimana pada dasarnya ekstrak teh hijau yang ditambahkan merupakan teh hijau yang telah diekstraksi (dengan suatu metode) yang berfungsi meredam radikal bebas pada saat pembekuan.

4. Suatu komposisis media pembekuan semen sapi Simental sesuai klaim 1 sampai 3 dimana ekstrak teh hijau tersebut diisolasi dari pucuk daun teh yang di tanam didaerah

Jawa Barat



