

**Ranah Research****Journal of Multidisciplinary Research and Development**

082170743613

ranahresearch@gmail.com

<https://jurnal.ranahresearch.com>

E-ISSN: 2655-0865

DOI: <https://doi.org/10.38035/rj.v7i5><https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Suplementasi Ekstrak Teh Hijau Dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Sapudi Yang Disimpan Pada Suhu Dingin (5°C)

Ahda Idzha Safira¹, Suherni Susilowati², Eduardus Bimo Aksono Heruprodoto³, Kadek Rachmawati⁴, Tatik Hernawati⁵

¹Universitas Airlangga, Jawa Timur, Indonesia

²Universitas Airlangga, Jawa Timur, Indonesia

³Universitas Airlangga, Jawa Timur, Indonesia

⁴Universitas Airlangga, Jawa Timur, Indonesia

⁵Universitas Airlangga, Jawa Timur, Indonesia

Corresponding Author: ahidzhafira@gmail.com¹

Abstract: The purpose of this research was determined the effect and the best concentration of green tea extract in skim milk and egg yolk diluent for spermatozoa quality of Sapudi sheep were measured in motility, viability, and plasma membrane integrity that was stored on cold temperature. The semen was divided into four groups; skim milk and egg yolk diluent, 0.10% green tea extract in skim milk and egg yolk diluent, 0.15% green tea extract in skim milk and egg yolk diluent, and 0.20% green tea extract in skim milk and egg yolk diluent. Spermatozoa quality was observed at day 1, day 2, day 3, day 4, and day 5 after being diluted. The results showed that the highest percentage of motility, viability, and plasma membrane integrity was 0.20% green tea extract on skim milk and egg yolk diluent for 5 days storage is $54.46^a \pm 1.72$, $69.71^a \pm 2.15$, and $42.76^a \pm 2.68$. The lowest percentage of motility, viability, and plasma membrane integrity was skim milk and egg yolk diluent for 5 days storage is $43.33^c \pm 2.98$, $63.35^c \pm 2.35$, and $36.39^c \pm 2.14$. The conclusion of this research is the addition of 0,20% green tea extract in skim milk and egg yolk diluent can maintain the quality of spermatozoa for up to 5 days of storage on cold temperature.

Keyword: Skim milk and egg yolk; green tea extract; spermatozoa quality; Sapudi sheep

Abstrak: Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dan konsentrasi terbaik ekstrak teh hijau dalam pengencer susu skim dan kuning telur terhadap kualitas spermatozoa domba Sapudi yang diukur dari motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma yang disimpan pada suhu dingin. Semen dibagi menjadi empat kelompok, yaitu pengencer susu skim dan kuning telur, ekstrak teh hijau 0,10% dalam pengencer susu skim dan kuning telur, ekstrak teh hijau 0,15% dalam pengencer susu skim dan kuning telur, dan ekstrak teh hijau 0,20% dalam pengencer susu skim dan kuning telur. Kualitas spermatozoa diamati pada hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3, hari ke-4, dan hari ke-5 setelah pengenceran. Hasil penelitian

menunjukkan bahwa persentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma tertinggi adalah ekstrak teh hijau 0,20% pada pengencer susu skim dan kuning telur selama penyimpanan 5 hari yaitu $54,46a \pm 1,72$, $69,71a \pm 2,15$, dan $42,76a \pm 2,68$. Persentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma terendah adalah ekstrak teh hijau 0,20% pada pengencer susu skim dan kuning telur selama penyimpanan 5 hari yaitu $43,33c \pm 2,98$, $63,35c \pm 2,35$, dan $36,39c \pm 2,14$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan ekstrak teh hijau 0,20% pada pengencer susu skim dan kuning telur dapat mempertahankan kualitas spermatozoa hingga penyimpanan 5 hari pada suhu dingin.

Kata Kunci: Susu skim dan kuning telur; ekstrak teh hijau; kualitas spermatozoa; domba Sapudi

PENDAHULUAN

Domba Sapudi berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2389/Kpts/LB.430/8/2012 merupakan salah satu kekayaan sumber genetik ternak lokal Indonesia yang harus dilindungi dan dilestarikan. Domba sapudi mempunyai sebaran asli geografis di Provinsi Jawa Timur serta telah dibudidayakan secara turun temurun. Domba merupakan salah satu ternak yang memiliki prospek yang cukup besar untuk dikembangkan, sehingga mampu memenuhi kebutuhan daging. Domba sapudi diharapkan menjadi salah satu penyuplai daging nasional. Untuk mencapai harapan tersebut, perlu dilakukan perkembangan dalam hal pembibitan untuk menjaga ketersediaannya (Ashari dkk., 2015).

Kebijakan pemerintah untuk menurunkan jumlah daging impor agar dapat memenuhi kebutuhan daging nasional perlu digalakkan usaha peternakan sapi, kambing, domba, dan kerbau dengan cara melakukan: *breeding*, *genetic engineering*, teknologi dan program pakan serta kontrol terhadap penyakit pada ternak ruminansia (Rachmawati, 2018). Salah satu cara *breeding* yaitu dengan melakukan inseminasi buatan. Inseminasi buatan (IB) adalah kegiatan memasukkan semen hewan jantan ke dalam alat reproduksi hewan betina sehat dengan memakai alat inseminasi agar hewan betina tersebut menjadi bunting (Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2012). Tujuan dilaksanakannya inseminasi buatan ini dapat dilihat dari sisi mikro dan makro yang selaras. Tujuan dari sisi mikro inseminasi buatan ini dilakukan untuk menaikkan produktivitas serta kualitas ternak. Semen yang diinseminasikan tentunya didapatkan dari hewan jantan unggul dengan harapan untuk mendapatkan keturunan yang mempunyai kualitas unggul pula. Sedangkan tujuan dari sisi makro ialah inseminasi buatan dilakukan untuk meningkatkan populasi dan produksi (Suprianto, 2016).

Penyimpanan semen memiliki tujuan untuk mengoptimalkan penggunaan dan penyebaran bibit dari pejantan unggul di tempat yang membutuhkan. Salah satu metode penyimpanan semen yaitu penyimpanan pada suhu dingin. Semen didinginkan pada suhu 5°C untuk menekan metabolisme spermatozoa sehingga memungkinkan semen dapat digunakan dalam program inseminasi buatan paling tidak untuk disimpan selama 3 hari (Suyadi dkk., 2012).

Komposisi bahan pengencer sangat menentukan kualitas spermatozoa untuk inseminasi buatan. Daya fertilisasi optimum spermatozoa harus dipreservasi atau diawetkan setelah penampungan untuk mempertahankan kualitasnya. Oleh karena itu, spermatozoa perlu dicampur dengan bahan pengencer yang menjamin kebutuhan fisik dan kimiawinya serta disimpan dalam suhu dan kondisi tertentu serta dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa selama waktu yang diinginkan untuk kemudian dipakai sesuai kebutuhan (Dwitarizki dan Asmarawati, 2015). Susu skim kuning telur merupakan bahan yang umum digunakan sebagai pengencer karena telah memenuhi syarat pengenceran yaitu mengandung nutrisi untuk spermatozoa, melindungi membran spermatozoa dari *cold shock* serta bersifat *buffer* atau penyangga (Ari *et al.*, 2011).

Dalam proses pengolahannya, semen banyak berkontak dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen sehingga akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Gunawan, 2012). Radikal bebas yang juga disebut sebagai ROS (*reactive oxygen species*) sangat berbahaya bagi spermatozoa karena dapat menyebabkan rusaknya membran plasma (Bebas dkk., 2016). Pembentukan radikal anion seperti *reactive oxygen species* (ROS) akan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif yang dapat menyebabkan timbulnya berbagai penyakit sampai kematian sel (Anand *et al.*, 2017). Penambahan zat antioksidan dalam bahan pengencer dapat mencegah aktivitas radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel spermatozoa yang berpengaruh terhadap fertilitas dan viabilitas spermatozoa, berperan sebagai sumber energi untuk mempertahankan motilitas spermatozoa, selain itu juga bermanfaat untuk memperbaiki komposisi dari pengencer (Aslam dkk., 2014).

Komponen utama yang dimiliki teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah polifenol, yang paling penting yaitu flavonoid. Flavonoid utama dalam teh adalah katekin. Katekin teh hijau dengan konsentrasi tertinggi adalah *epigallocatechin gallate* (EGCG), mewakili sekitar 59% dari jumlah katekin (Reygaert, 2014) yang menyebabkan *epigallocatechin gallate* (EGCG) bertanggung jawab atas sebagian besar aktivitas biologis pada tanaman teh (Mereles dan Hunstein, 2011).

METODE

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan enam ulangan untuk masing-masing perlakuan. Penentuan jumlah ulangan berdasarkan ketentuan $t(n-1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008). Sampel dalam penelitian ini adalah semen dari domba Sapudi berumur 3,5 tahun yang dipelihara di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Domba yang digunakan memenuhi kriteria telah dewasa kelamin, memiliki alat kelamin normal, dalam kondisi sehat, dan sedang mengalami peningkatan libido. Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu selama tiga minggu.

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali. Variabel bebas yang diamati adalah konsentrasi ekstrak teh hijau, sedangkan variabel tergantung meliputi motilitas, viabilitas, dan membran plasma utuh spermatozoa. Adapun variabel kendali meliputi pengencer susu skim kuning telur, volume semen, pakan, pemeliharaan, umur, jenis domba, serta suhu dingin.

Penelitian ini dilakukan di kandang domba Sapudi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk pengambilan semen, dan proses penelitian dilanjutkan di Laboratorium Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Waktu pelaksanaan penelitian berlangsung dari bulan Maret hingga Mei 2022.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi semen domba Sapudi, susu skim, kuning telur, ekstrak teh hijau merek Meditea, Penicillin, Streptomycin, larutan warna eosin-negrosin, vaseline, NaCl fisiologis, larutan HOS, aquades, aquabides, dan alkohol 70%. Sementara itu, alat-alat yang digunakan antara lain satu set vagina buatan, tabung berskala, tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, pipet hisap, timbangan mikro, kertas saring, kertas label, spuit 1 ml, erlenmeyer, batang pengaduk, pembakar bunsen, termos air, gelas objek, gelas penutup, termometer, gelas ukur, kertas pH, aluminium foil, tisu, mikroskop cahaya, serta lemari pendingin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pemeriksaan Semen Sebelum Perlakuan

Semen domba Sapudi ditampung menggunakan vagina buatan kemudian dilakukan pemeriksaan terhadap kualitasnya. Kualitas semen segar dapat diketahui melalui dua cara yaitu pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis yang

diamati meliputi bau, warna, pH, volume, dan konsistensi (Sholikhah, 2016). Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma (Iskandari dkk., 2020). Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar domba Sapudi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar domba sapudi

Ulangan	Vol (ml)	Warna	Bau	Konsistensi	pH
1	1,5	Putih krem	Khas	Kental	6,8
2	1,5	Putih krem	Khas	Kental	6,8
3	1,2	Putih krem	Khas	Kental	6,8
4	1,5	Putih krem	Khas	Kental	6,8
5	1,4	Putih krem	Khas	Kental	6,8
6	1,5	Putih krem	Khas	Kental	6,8
Rata-rata	1,43	Putih krem	Khas	Kental	6,8

Sumber: data Riset

Tabel 2. Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar domba Sapudi

Ulangan	Konsentrasi (jt/ml)	Gerakan Massa	Motilitas	Viabilitas	MPU
1	2.550	+++	86,67%	87,69%	72,31%
2	2.460	+++	83,33%	84,44%	71,11%
3	2.760	+++	85%	85,38%	71,54%
4	2.220	+++	83,33%	84,62%	70,77%
5	3.060	+++	86,67%	87,14%	71,43%
6	2.940	+++	85%	85,52%	71,73%
Rata-rata	2.665	+++	85%	85,80%	71,48%

Sumber: data Riset

Ket: +++ = Sangat baik. Jika terlihat gelombang-gelombang besar, tebal, banyak, dan aktif bergerak.

Pemeriksaan Semen Sesudah Perlakuan

a. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400× dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang bergerak progresif dibandingkan dengan total seluruh spermatozoa yang ada dalam satu lapang pandang pengamatan. Hasil pemeriksaan rata-rata dan standar deviasi persentase motilitas spermatozoa domba Sapudi tersaji pada Tabel 3.

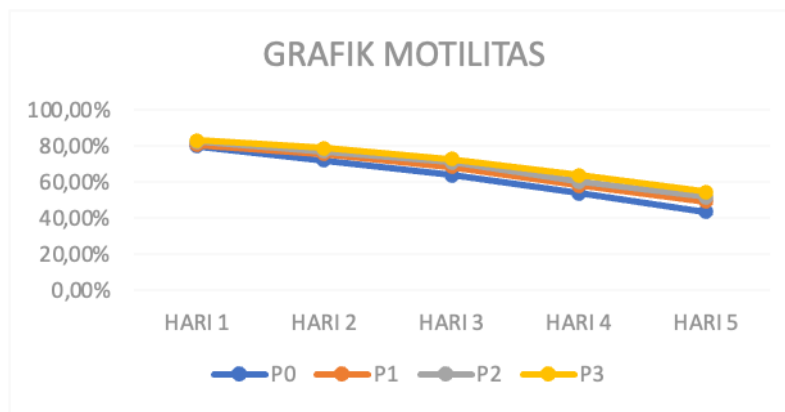
Tabel 3. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa domba Sapudi

	Rata-rata ± Standar Deviasi				
	HARI 1	HARI 2	HARI 3	HARI 4	HARI 5
P0	80.00 ^b ±0.00	72.22 ^b ±3.28	63.89 ^b ±4.04	53.89 ^c ±4.30	43.33 ^c ±2.98
P1	80.83 ^b ±1.39	75.83 ^{ab} ±2.74	68.33 ^{ab} ±3.34	58.06 ^{bc} ±3.86	49.17 ^b ±2.30
P2	82.50 ^a ±0.91	76.94 ^a ±3.56	71.11 ^a ±4.30	60.28 ^{ab} ±4.14	51.67 ^{ab} ±2.11
P3	83.33 ^a ±1.49	78.89 ^a ±2.51	72.78 ^a ±4.17	63.89 ^a ±3.10	54.46 ^a ±1.72

Sumber: data Riset

Ket: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05)

Berdasarkan tabel 3 dapat digambarkan pengaruh dari keempat perlakuan terhadap persentase motilitas spermatozoa domba Sapudi pada pengamatan hari 1, hari 2, hari 3, hari 4, dan hari 5. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa domba Sapudi dapat dilihat pada Gambar 4.1.



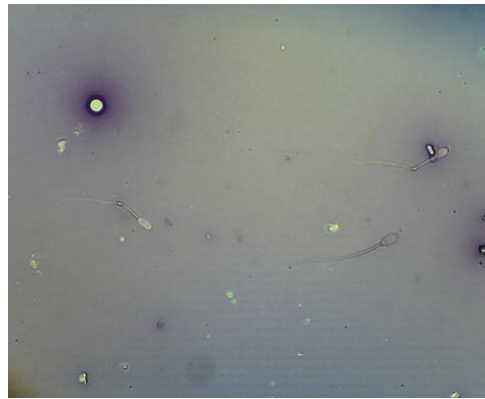
Sumber: Hasil Riset

Gambar 1. Grafik rata-rata persentase motilitas spermatozoa domba Sapudi

Berdasarkan hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan terhadap motilitas (Lampiran 8) pada hari pertama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3 begitu pula antara P1 dengan P2 dan P3. Data antara P2 dengan P3 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Motilitas terendah pada hari pertama didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kedua menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antara P0 dengan P1 ($p > 0,05$) namun jika dibandingkan dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Dapat dilihat pada perlakuan antara P1 dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Motilitas terendah pada hari kedua didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari ketiga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antara P0 dengan P1 ($p > 0,05$) tetapi jika dibandingkan dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Dapat dilihat pada perlakuan antara P1 dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Motilitas terendah pada hari ketiga didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari keempat menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antara P0 dengan P1 ($p > 0,05$) tetapi jika dibandingkan dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu pula antara P2 dengan P3. Namun, P1 berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Motilitas terendah pada hari keempat didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kelima menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara P0 dengan P1, P2, dan P3 ($p < 0,05$) begitu pula antara P1 dengan P3. Namun, P2 tidak berbeda nyata dengan P3 ($p > 0,05$). Motilitas terendah pada hari kelima didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan motilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3.

b. Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa

Pemeriksaan viabilitas spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400× dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang hidup dibandingkan dengan total seluruh spermatozoa minimal jumlahnya 100. Perbedaan spermatozoa yang hidup dan mati dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil pemeriksaan rata-rata dan standar deviasi viabilitas motilitas spermatozoa domba Sapudi tersaji pada Tabel 4.



Gambar 2. Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa (a) spermatozoa yang kepalanya tidak terwarnai menunjukkan spermatozoa hidup, (b) spermatozoa yang kepalanya merah keuangun menunjukkan spermatozoa mati

Sumber: Hasil Riset

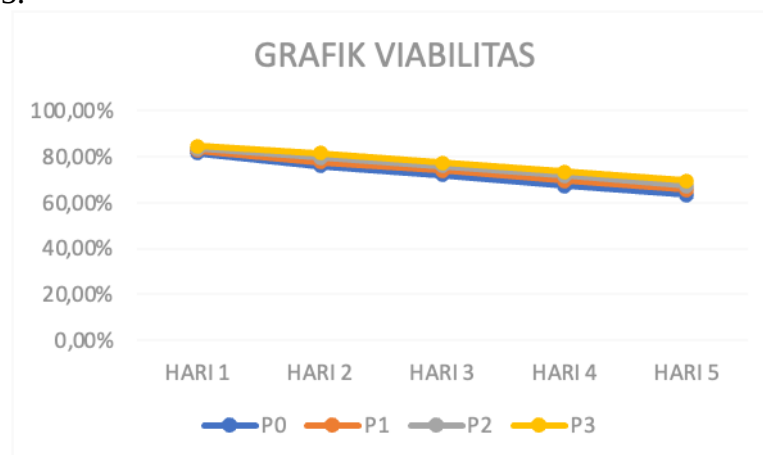
Tabel 4. Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa domba Sapudi

	Rata-rata $\pm$ Standar Deviasi				
	HARI 1	HARI 2	HARI 3	HARI 4	HARI 5
P0	81.61c $\pm$ 1.15	76.03c $\pm$ 1.69	72.16c $\pm$ 1.58	67.36c $\pm$ 2.08	63.35c $\pm$ 2.35
P1	82.60bc $\pm$ 1.25	77.70bc $\pm$ 1.39	74.05bc $\pm$ 1.92	69.46bc $\pm$ 2.15	65.63bc $\pm$ 2.21
P2	83.46ab $\pm$ 1.43	79.61ab $\pm$ 2.12	76.00ab $\pm$ 1.80	71.69ab $\pm$ 2.29	67.29ab $\pm$ 2.47
P3	84.70a $\pm$ 1.49	81.45a $\pm$ 2.75	77.51a $\pm$ 2.20	73.61a $\pm$ 2.14	69.71a $\pm$ 2.15

Sumber: data Riset

Ket: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 4 dapat digambarkan pengaruh dari keempat perlakuan terhadap persentase viabilitas spermatozoa domba Sapudi pada pengamatan hari 1, hari 2, hari 3, hari 4, dan hari 5. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa domba Sapudi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik rata-rata persentase viabilitas spermatozoa domba Sapudi

Berdasarkan hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan terhadap motilitas (Lampiran 9) pada hari pertama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Viabilitas terendah pada hari pertama didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kedua menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun,

P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Viabilitas terendah pada hari kedua didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari ketiga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Viabilitas terendah pada hari ketiga didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari keempat menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Viabilitas terendah pada hari keempat didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kelima menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Data antara P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. Viabilitas terendah pada hari kelima didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan viabilitas tertinggi didapatkan pada perlakuan P3.

c. Pemeriksaan Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran $400\times$ dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang ekornya melingkar dibandingkan dengan total seluruh spermatozoa minimal jumlahnya 100. Perbedaan spermatozoa yang membran plasmanya masih utuh dan tidak dapat dilihat di Gambar 4. Hasil pemeriksaan rata-rata dan standar deviasi membran plasma utuh motilitas spermatozoa domba Sapudi tersaji pada Tabel 5.



Gambar 4. Pemeriksaan Membran Plasma Utuh Spermatozoa (a) spermatozoa dengan ekor melingkar menunjukkan spermatozoa yang membran plasmanya utuh (b) spermatozoa dengan ekor lurus menunjukkan spermatozoa yang membran plasmanya rusak

Tabel 5. Hasil pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa domba Sapudi

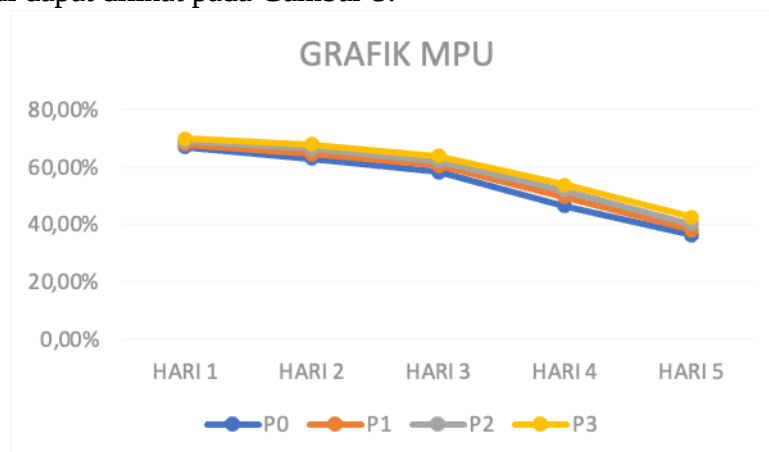
	Rata-rata $\pm$ Standar Deviasi				
	HARI 1	HARI 2	HARI 3	HARI 4	HARI 5
P0	67.07 ^d $\pm$ 0.53	62.96 ^d $\pm$ 1.66	58.24 ^c $\pm$ 2.54	46.49 ^c $\pm$ 2.71	36.39 ^c $\pm$ 2.14
P1	68.04 ^c $\pm$ 0.67	64.61 ^c $\pm$ 1.07	60.45 ^{bc} $\pm$ 2.67	49.58 ^b $\pm$ 2.37	38.24 ^{bc} $\pm$ 2.13

	Rata-rata $\pm$ Standar Deviasi				
	HARI 1	HARI 2	HARI 3	HARI 4	HARI 5
P2	69.15 ^b $\pm$ 0.56	66.38 ^b $\pm$ 0.96	62.09 ^{ab} $\pm$ 2.32	51.82 ^{ab} $\pm$ 2.15	40.11 ^{ab} $\pm$ 2.22
P3	69.93 ^a $\pm$ 0.61	67.93 ^a $\pm$ 0.72	63.88 ^a $\pm$ 2.05	53.91 ^a $\pm$ 1.92	42.76 ^a $\pm$ 2.68

Sumber: data Riset

Ket: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan tabel 5 dapat digambarkan pengaruh dari keempat perlakuan terhadap persentase membran plasma utuh spermatozoa domba Sapudi pada pengamatan hari 1, hari 2, hari 3, hari 4, dan hari 5. Rata-rata persentase membran plasma utuh spermatozoa domba Sapudi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4.5 Grafik rata-rata persentase MPU spermatozoa domba Sapudi

Berdasarkan hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan terhadap MPU (Lampiran 10) pada hari pertama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan P0, P1, P2, dan P3. MPU terendah pada hari pertama didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan MPU tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kedua menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan P0, P1, P2, dan P3. MPU terendah pada hari kedua didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan MPU tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari ketiga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, P0 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P2 dan P3. Pada perlakuan P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, pada perlakuan antara P1 dengan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). MPU terendah pada hari ketiga didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan MPU tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari keempat menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antara P0 dengan P1, P2, dan P3. Data pada perlakuan P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dengan P3. Namun, P1 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan P3. MPU terendah pada hari keempat didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan MPU tertinggi didapatkan pada perlakuan P3. Pada hari kelima menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara P0 dengan P1. Namun, jika dibandingkan dengan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Data pada perlakuan P1 dengan P2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) begitu juga antara P2 dan P3. Namun, pada perlakuan antara P1 dengan P3 menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$). MPU terendah pada hari kelima didapatkan pada kelompok kontrol P0 dan MPU tertinggi didapatkan pada perlakuan P3.

Pembahasan

Evaluasi Kualitas Semen Sebelum Perlakuan

Evaluasi kualitas semen domba segar bertujuan untuk mengetahui kualitas semen yang baik dan memenuhi syarat untuk dimanfaatkan dalam program inseminasi buatan. Evaluasi kualitas semen domba yang dilakukan sebelum perlakuan meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis yang diamati meliputi bau, warna, pH, volume, dan konsistensi (Sholikah, 2016). Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma (Iskandari dkk., 2020).

Hasil pemeriksaan secara makroskopis didapatkan semen berwarna putih krem. Warna semen merupakan gambaran konsistensi semen. Semen yang memiliki konsistensi kental warnanya akan semakin pekat (Susilowati dan Tatik, 2011). Volume semen domba yang didapatkan dalam satu kali ejakulasi rata-rata 1,43 ml. Hal ini sesuai dengan Hardijanto dkk. (2010) yang menyebutkan bahwa semen domba yang diambil menggunakan vagina buatan memiliki volume berkisar 0,5-2 ml. Volume per ejakulasi semen domba berbeda-beda tergantung breed, ukuran tubuh, umur, jenis makanan dan sebagainya (Susilowati dkk., 2010). Semen memiliki bau normal yaitu bau khas semen. Hasil pemeriksaan derajat keasaman (pH) didapatkan rata-rata 6,8. Hardijanto dkk. (2010) menyatakan bahwa semen domba yang subur berkisar antara 5,9-7,0.

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis didapatkan rata-rata gerakan massa +++, persentase motilitas spermatozoa progresif 85%, persentase viabilitas 85,80%, persentase membran plasma utuh 71,48%. Hal ini sesuai dengan Susilowati dan Tatik (2011) yang menyatakan bahwa spermatozoa yang layak untuk dilakukan perlakuan lebih lanjut memiliki gerakan massa +++ serta memiliki persentase motilitas dan viabilitas $\geq 70\%$. Persentase membran plasma utuh yang didapatkan juga dikatakan baik karena persentase membran plasma utuh semen segar $< 60\%$ dikategorikan sebagai semen yang infertil (Revell dan Mrode, 1994 dalam Rizal, 2013). Semen domba segar juga dihitung konsentrasinya menggunakan spectrophotometer dan didapatkan rata-rata 2.665 juta/ml. Rizal dkk. (2013) menyebutkan bahwa konsentrasi spermatozoa yang layak digunakan ≥ 2.000 juta/ml. Berdasarkan hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis dapat disimpulkan bahwa semen segar domba Sapudi yang digunakan untuk penelitian telah memenuhi syarat dan memiliki kualitas yang baik sehingga dapat diproses lebih lanjut dan dimanfaatkan dalam program inseminasi buatan.

Evaluasi Kualitas Spermatozoa Setelah Perlakuan

a. Motilitas Spermatozoa

Motilitas merupakan salah satu parameter untuk mengetahui kualitas spermatozoa. Nilai motilitas merupakan hal penting yang dapat mempengaruhi tingkat fertilitas spermatozoa dalam membuahi ovum (Istanty dkk., 2017). Penurunan motilitas yang terjadi dapat diakibatkan oleh beberapa faktor diantaranya yaitu suhu dan lama waktu penyimpanan. Semakin lama waktu penyimpanan pada suhu dingin mengakibatkan semakin turunnya motilitas spermatozoa (Suprayogi and Susilowati, 2018). Hal ini disebabkan karena terjadinya peroksidasi lipid akibat ROS sehingga merusak membran plasma spermatozoa. Membran plasma sel terdapat banyak makromolekul yang dibutuhkan dalam proses metabolisme dan sebagai pelindung organel-organel di dalam sel dari kerusakan mekanik. Hasil metabolisme adalah energi berupa ATP yang diperlukan untuk daya gerak (motilitas) spermatozoa. Kerusakan membran plasma sel akan mengakibatkan terganggunya suplai energi dan pada akhirnya menurunkan motilitas spermatozoa. Rendahnya motilitas pada akhirnya akan menyebabkan periode fertil dan fertilitas spermatozoa lebih singkat (Danang, 2012). Penurunan motilitas spermatozoa juga bisa disebabkan oleh kejutan dingin (*cold shock*), semakin berkurangnya zat-zat makanan,

dan perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat di dalam bahan pengencer (Amtiran dkk., 2020).

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh penambahan ekstrak teh hijau dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap motilitas spermatozoa. Penambahan antioksidan berupa ekstrak teh hijau membuat komposisi dari pengencer menjadi lebih baik. Komponen penting dari teh hijau adalah polifenol, yang paling penting adalah flavonoid. Flavonoid utama dalam teh adalah katekin dengan *epigallocatechin gallate* (EGCG) yang paling banyak jumlahnya (Denny dan Asep, 2018). Aktivitas antioksidan dari *epigallocatechin gallate* (EGCG) dari ekstrak teh hijau yang menghambat pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) yang berlebihan (Khamverdi *et al.*, 2016). Flavonoid mampu menangkap radikal bebas secara langsung melalui sumbangan atom hidrogen. Radikal dibuat tidak aktif di mana $R\cdot$ adalah radikal bebas dan $Fl-O\cdot$ adalah radikal fenoksil. Aktivitas antioksidan invitro flavonoid bergantung pada penataan gugus fungsi pada struktur intinya. Konfigurasi dan jumlah total gugus hidroksil secara substansial mempengaruhi mekanisme aktivitas antioksidan. Konfigurasi hidroksil cincin B adalah yang paling banyak menentukan penangkapan ROS, sedangkan substitusi cincin A dan C memiliki dampak kecil konstanta laju penangkapan radikal anion superoksida (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Kelompok perlakuan P3 (penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur) didapatkan persentase motilitas tertinggi pada hari pertama sampai hari kelima dibandingkan dengan perlakuan lainnya dengan persentase motilitas pada hari kelima sebesar 54,46%. Hal ini sesuai dengan Susilawati (2013) yang menyatakan bahwa nilai motilitas minimal untuk dilakukan inseminasi buatan yaitu sebesar 40%. Kelompok perlakuan P3 (penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur) didapatkan persentase motilitas tertinggi pada hari pertama sampai hari kelima dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur merupakan konsentrasi yang paling baik untuk mempertahankan motilitas spermatozoa domba Sapudi yang disimpan pada suhu dingin (5°C).

b. Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas merupakan salah satu parameter untuk mengetahui kualitas spermatozoa. Nilai viabilitas atau daya hidup spermatozoa penting diketahui untuk mengasumsikan berapa lama spermatozoa tetap hidup dalam saluran reproduksi betina (Woli dkk., 2017). Spermatozoa yang hidup warnanya akan tetap transparan karena tidak menyerap zat warna *eosin negrosin* sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna tersebut (Susilowati dkk., 2010). Nilai persentase viabilitas spermatozoa biasanya lebih tinggi dari persentase motilitas. Hal ini disebabkan karena spermatozoa yang tidak motil ada yang masih hidup, sedangkan spermatozoa motil sudah pasti hidup (Mesang-Nalley *et al.*, 2007 dalam Dwitarizki dan Asmarawati, 2015). Tingginya jumlah spermatozoa yang mati dapat menyebabkan toksik bagi spermatozoa yang masih hidup (Blegur dkk, 2020).

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh penambahan ekstrak teh hijau dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap viabilitas spermatozoa. Penambahan antioksidan berupa ekstrak teh hijau membuat komposisi dari pengencer menjadi lebih baik. Penambahan antioksidan dalam bahan pengencer dapat mencegah aktivitas radikal bebas penyebab rusaknya membran plasma spermatozoa yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Aslam dkk., 2014). Senyawa *epigallocatechin gallate* (EGCG) yang terdapat pada ekstrak teh hijau mampu menghambat pembentukan ROS dan peroksidasi lemak dengan meningkatkan aktivitas superoksida dismutase dan kadar glutation yang dapat mengurangi kerusakan oksidatif sehingga kematian spermatozoa dapat dicegah (Bartosikova dan Necas, 2018).

Kelompok perlakuan P3 (penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur) didapatkan persentase viabilitas tertinggi pada hari pertama sampai hari kelima dibandingkan dengan perlakuan lainnya dengan persentase viabilitas pada hari kelima sebesar 69,71%. Hal ini sesuai dengan Mugiyati dkk. (2017) yang menyatakan bahwa nilai viabilitas spermatozoa dikatakan baik yaitu di atas 50%. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur merupakan konsentrasi yang paling baik untuk mempertahankan viabilitas spermatozoa domba Sapudi yang disimpan pada suhu dingin (5°C).

c. Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Membran plasma utuh merupakan salah satu parameter untuk mengetahui kualitas spermatozoa. Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup (viabilitas) spermatozoa yang dihasilkan (Saili dan Rahadi, 2014). Keutuhan membran plasma (MPU) dievaluasi dengan *hypoosmotic swelling test* (HOST) (Gohar *et al.*, 2014). Selanjutnya, dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan di atas dengan 1 tetes eosin negrosin, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400× (Handayani dkk., 2015). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus (Anwar, 2015).

Dalam proses pengolahannya, semen banyak berkontak dengan udara luar yang mengandung banyak oksigen sehingga akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Gunawan, 2012). Radikal bebas yang juga disebut sebagai ROS (*Reactive Oxygen Species*) sangat berbahaya bagi spermatozoa karena dapat menyebabkan rusaknya membran plasma (Bebas dkk., 2016). Membran plasma spermatozoa rentan terhadap peroksidasi lipid oleh aktivitas ROS. Proses peroksidasi lipid ini terjadi pemecahan asam lemak tak jenuh sebagai penyusun terbesar membran plasma yang mengelilingi sel dan organel sel. Reaksi rantai peroksidasi lipid ini berlangsung terus-menerus hingga akhirnya menyebabkan perubahan fungsi membran yang mengakibatkan penurunan motilitas dan fertilitas spermatozoa (Febrianti dkk., 2014).

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh penambahan ekstrak teh hijau dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap viabilitas spermatozoa. Penambahan antioksidan berupa ekstrak teh hijau membuat komposisi dari pengencer menjadi lebih baik. Selama penyimpanan semen berlangsung akan terjadi kerusakan terhadap dekomposisi protein pada membran plasma sel sehingga lapisan lipoprotein pada sel akan menyebabkan terjadinya denaturasi protein yang disebabkan reaksi peroksidasi pada membran plasma sel (Nalley *et al.*, 2007 dalam Anwar dan Jiyanto, 2019). Kerusakan membran plasma tersebut dapat diminimalisir dengan penambahan antioksidan yang terdapat dalam ekstrak teh hijau karena teh hijau mengandung flavonoid katekin terutama *epigallocatechin gallate* (EGCG) (Suzuki *et al.*, 2016). Antioksidan memiliki dua fungsi yaitu sebagai pemberi atom hidrogen dan memperlambat laju autooksidasi melalui pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipid ke bentuk yang lebih stabil (Yuliani dan Lukman, 2013). Polifenol dan katekin teh hijau adalah donor elektron dari *reactive oxygen species* (ROS) fisiologis yang relevan secara *in vitro*, termasuk radikal peroksida superoksida anion, dan oksigen tunggal. Katekin teh hijau juga menunjukkan aktivitas antioksidan dengan menghambat enzim prooksidan dan mendorong enzim antioksidan (Denny dan Asep, 2018).

Kelompok perlakuan P3 (penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur) didapatkan persentase membran plasma utuh tertinggi pada hari pertama sampai hari kelima dibandingkan dengan perlakuan lainnya dengan

persentase membran plasma utuh pada hari kelima sebesar 42,76%. Hal ini sesuai dengan Rizal dan Herdis (2010) yang menyatakan bahwa nilai standar minimum membran plasma utuh spermatozoa yaitu 30%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak teh hijau sebesar 0,20% dalam bahan pengencer susu skim kuning telur merupakan konsentrasi yang paling baik untuk mempertahankan membran plasma utuh spermatozoa domba Sapudi yang disimpan pada suhu dingin (5°C). Membran plasma spermatozoa harus terjaga keutuhannya karena dapat mempengaruhi motilitas dan viabilitasnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak teh hijau ke dalam pengencer susu skim kuning telur mampu mempertahankan kualitas spermatozoa domba Sapudi yang disimpan pada suhu dingin (5°C). Penambahan ekstrak teh hijau terbukti efektif dalam mempertahankan motilitas spermatozoa, menjaga viabilitas spermatozoa, serta mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan. Dengan demikian, penggunaan ekstrak teh hijau sebagai bahan tambahan pada pengencer dapat menjadi salah satu upaya untuk meningkatkan keberhasilan dalam penyimpanan semen domba Sapudi pada suhu dingin.

REFERENSI

- Abella D, F., M. Da Costa, Y. Y Guerin, & L. Dacheux J. 2015. Fertility of Undiluted Ram Epididymal Spermatozoa Stored for Several Days at 4° C. *Animal* 9. 313-319.
- Akmal, M., D. Masyitah, Hafizuddin dan Fitriani. 2015. Epididimis dan Perannya pada Pematangan Spermatozoa. *Jesbio*. 4(2): 1-9.
- Allai, L., D. Xavier, C. Jesus, L. Noureddine, B.M. Moula, B. Abdelmoughit, E. Abdelkhalid, N. Boubker, & E.A. Bouchra. 2015. Effect of Argan Oil on Liquid Storage of Ram Semen in Tris or Skim Milk Based Extenders. *Anim Reprod Sci*, 160: 57-67.
- Allapat, B., J. Sarna, & C. Truong. 2015. Anticancer and Antioxidant Properties of Flavored Green Tea Extracts. *Journal of Agriculture and Life Science*. 2(1): 15-24.
- Amtiran, D. E., T. M. Hine, dan K. Uly. 2020. Pengaruh Penambahan Vitamin E dalam Pengencer Tris-Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Duroc. *Jurnal Peternakan Lahan Kering*. 2(4):1111-1118.
- Anand, A., J. Chawla, A. Mahajan, N. Sharma, & N. Khurana. 2017. Therapeutic Potential of Epigallocatechin Gallate. *International Journal of Green Pharmacy*. 11(3): S364-70.
- Anwar, P., Y. S. Ondho, dan D. Samsudewa. 2015. Kualitas Membran Plasma Utuh Dan Tudung Akrosom Utuh Spermatozoa Sapi Bali Dipreservasi Suhu 5 0c Dalam Pengencer Ekstrak Air Tebu Dengan Penambahan Kuning Telur. *AGROMEDIA: Berkala Ilmiah Ilmu-ilmu Pertanian*. 33(1).
- Anwar, P. dan J. Jiyanto. 2019. Efektivitas Sukrosa sebagai Proteksi Aktif Membran Ekstraseluler Spermatozoa Sapi Bali pada Zona Pre-Freezing. *Jurnal Agripet*. 19(1): 77-84.
- Ari, U.C., R. Kulaksi, & Y. Ozturkler. 2011. Freezability of Tushin Ram Semen Extended with Goat or Cow Milk Based Extenders. *Reprod Dom Anim*, 46(6): 975-979.
- Ariantje, O. S., T. L. Yusuf, D. Sajuthi, dan R. I. Arifiantini. 2014. Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah dalam Modifikasi Pengencer tris dengan Trehalosa dan Rafinosa. *Jurnal Veteriner*, 15(1): 11-22.
- Arifin, B. dan S. Ibrahim. 2018. Struktur, bioaktivitas dan antioksidan flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21-29.
- Ashari, M., Rr. A. Suhardaini, dan R. Andriati. 2015. Tampilan Bobot Badan dan Ukuran Linier Tubuh Domba Ekor Gemuk pada Umur Tertentu di Kabupaten Lombok Timur. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia* Vol 1(1): 24-30.

- Aslam, H. A., Dasrul dan Rosmaidar. 2014. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Andromed terhadap Presentase Motilitas dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan. *J Med Vet* 8(1): 20-26.
- Astuti, M. E. 2017. Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*) sebagai Pengencer Alami terhadap Kualitas Penyimpanan Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Jurnal Bionature* 18 (2): 129-139.
- Bartosikova, L. dan J. Necas. 2018. Epigallocatechin Gallate: A Review. *Veterinari Medicina*. 63(10): 443– 67.
- Bebas, W., G. L. Buyona, dan M. K. Budiasa. 2016. Penambahan vitamin E pada pengencer BTS® terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi landrace pada penyimpanan 15°C. *Buletin Veteriner Udayana*. 8(1): 1-7.
- Blegur, J., W. M. Nalley, dan T. M. Hine. 2020. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Selama Preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(2): 130-138.
- Chen, X., Z. Deng, C. Zhang, S. Zheng, Y. Pan, H. Wang, & H. Li. 2018. Is Antioxidant Activity of Flavonoids Mainly Through the Hydrogen-atom transfer mechanism? *Food Research International*.
- Danang, D. R., N. Isnaini, dan P. Trisunuwati. 2012. Pengaruh lama simpan semen terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dalam pengencer ringer's pada suhu 4 C. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*. 13(1): 47-57.
- Darmawan, H. dan H. Supartini. 2012. Heretabilitas dan Nilai Pemuliaan Domba Ekor Gemuk di Kabupaten Situbondo. *Buana Sains*. 12(1): 51-62.
- Davinelli, S., N. Sapere, D. Zella, R. Bracale, M. Intrieri, & G. Scapagnini. 2012. Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Denny, H. dan S. Asep. 2018. Aktivitas antioksidan dan antimikrobal pada polifenol teh hijau. *AGROMEDICINE UNILA*, 5(2), 587-591.
- Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2012. Optimalisasi Inseminasi Buatan (IB) Tahun 2012. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Kementrian Pertanian. Jakarta.
- Durairajayanagam, D., A. Agarwal, C. Ong, & P. Prahast. 2014. Lycopene and Male Infertility. *Asian J Androl*. 16: 420-425.
- Dwitarizki, N. D. dan W. Asmarawati. 2015. Pengaruh Pengenceran Sperma dengan Air Kelapa dan Aras Kuning Telur Itik serta Lama Penyimpanan terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Garut pada Penyimpanan 5 C. *Buletin Peternakan*, 39(3), 149-156.
- Febrianti, K. I., S. Rahayu, A. Purnama, & A. Soewondo. 2014. Kadar MDA spermatozoa setelah proses pembekuan. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 2(3): 142-147.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Alfabeta. Bandung.
- Franks, M., L. Peter, A. Alireza, & D. Robin. 2019. The Influence of Water Composition on Flavor and Nutrient Extraction in Green and Black Tea. *Nutrients*. 11(1).
- Gohar, A., H. Khan, M. S. Yousaf, J. Ahmad, Q. Ali, M. Khan, D. Khan, Y. Hayat, F. Ali, I. Ahmad, M. Saleem & F. Ullah. 2014. Assessment of Alpha Lipoic Acid Inclusion in Semen Extender on Cryopreservation of Nili-Ravi.
- Gunawan, I. N. D. R. A., D. N. D. I. Laksmi, & I. G. N. B. Trilaksana. 2012. Efektivitas penambahan β -karoten dan glutathion pada bahan pengencer terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa pada semen beku sapi. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(3), 385-393.
- Handayani, L., D. Dasrul, M. Akmal, C. N. Thasmi, H. Hamdan, dan M. Adam. 2015. Pengaruh Metode Pencucian Spermatozoa Sapi Aceh Terhadap Motilitas, Persentase

- Hidup, dan Integritas Membran Plasma Utuh Spermatozoa. *Jurnal Medika Veterinaria*: 9(2).
- Hardijanto, S., T. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito, dan W. Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Herawati, T., A. Anggreani, L. Praharani, D. Utami, dan A. Argiris. 2012. Peran Inseminator dalam Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Perah. *Informatika Pertanian*. Vol 21(2): 81-88.
- Herupradoto, E. B. A. 2011. Modulation Effect of ethanol extract of Benalu Tea (*Scurrula oortiana*) againsts antibody titers of broilers With Gumboro Virus infected. *Proceeding Kongres Nasional Pertama Asosisasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia (AFFAVETI)*.
- Irawan, R. 2016. Pengaruh Level Gliserol Dalam Pengencer Tris-Kuning Telur Terhadap Membran Plasma Utuh dan Recovery Rate Sperma Kambing Peranakan Etawah Post Thawing. *Students e-Journal*, 5(2).
- Iskandari, N. N., S. P. Madyawati, P. A. Wibawati, T. W. Suprayogi, R. A. Prastiya, dan B. Agustono. 2020. Perbandingan pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa kambing sapera pada penyimpanan suhu 5°C. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(2): 196-202.
- Ismudiono, P. Sriyanto, H. Anwar, S. P. Madyawati, A. Samik, dan E. Safitri. 2010. Buku Ajar Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Cetakan 1. Airlangga University Press. Surabaya.
- Istanty A. S., M. A. Salim, N. Isnaini, dan T. Susilawati. 2017. Pengaruh Penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan Putih Telur dalam Pengencer Dasar CEP-2 terhadap Kualitas Semen kambing Boer pada Simpan Dingin. *Jurnal Ternak Tropika* 18(1): 1-9.
- Khamverdi, Z., K. Parvin, S. Aliraza, & A. Maryam. 2016. In-Vitro Evaluation of The Effect of Herbal Antioxidant on Shear Bond Strength of Composite Resin to Bleached Enamel. *Indian Journal of Dental Research*. 13(4): 244- 251.
- Khamverdi, Z., L. Rezaei-Soufi, N. Ronasi, & S. Rostami. 2013. Effect of Epigallocatechin Gallate on Shear Bond Strength of Composite Resin to Bleached Enamel: An In-Vitro Study. *Restorative Dentistry and Endodontics*. 38(4): 241.
- Krupkova, O., S. J. Ferguson, & Wuertz-Kozak. 2016. Stability of (-)- epigallocatechin gallate and its activity in liquid formulations and delivery systems. *The Journal of nutritional biochemistry*, 37, 1-12.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusriningrum. 2010. Perancangan Percobaan. Universitas Airlangga. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lubis, T. M., C. N. Dasrul, Thasmi, dan T. Akbar. 2013. Efektivitas Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Setelah Penyimpanan Dingin. *Jurnal S. Pertanian*. 3(1): 347-361.
- Martono, Y. dan S. Martono. 2012. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Penetapan Kadar Asam Galat, Kafein dan Epigalokatekin Galat pada Beberapa Produk Teh Celup. *Agritech*. 32(04): 362-369.
- Menteri Pertanian. 2012. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2389/Kpts/LB.430/8/2012. Penetapan Rumpun Domba Sapudi. 1-3.
- Mereles, D. & W. Hunstein. 2011. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises? *International Journal of Molecular Sciences*. 12(9): 5592-5603.
- Mugiyati, M., N. Isnaini, M. Salim dan T. Susilawati. 2017. Pengaruh Air Kelapa Merah yang Muda dan Tua Sebagai Pengencer Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Selama Penyimpanan Dingin. *JTAPRO*. 18(1): 20-26.
- Mulyono, S. dan B. Sarwono. 2004. Beternak Domba Profilik. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Nugroho, Y., T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin selama Pendinginan Menggunakan Pengencer Cep-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Kuning Telur dan Sari Buah Jambu Biji (*Psidium guajava*). *Jurnal Ternak Tropika*. 15(1): 31-42.
- Puteri, T. H., T. S. Enny, dan S. O. Yon. 2019. Pengaruh *Indigofera* sp. sebagai Suplemen Pengencer Semen terhadap Persentase Hidup dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa. In *Prosiding Seminar Nasional Fakultas Pertanian UNS* (Vol. 3, No. 1, pp. D-108).
- Putra, W. S. 2015. *Kitab Herbal Nusantara: Aneka Resep dan Ramuan Tanaman Obat untuk Berbagai Gangguan Kesehatan*. Kata Hati. Yogyakarta.
- Rachmawati, K. dan H. Pertiwi. 2018. Suplementasi Diet Konsentrat Kaya Omega-3 dan Mineral Lick Terhadap Keamanan Fungsi Hati, Ginjal dan Produk Daging Pada Hewan Ruminansia. Laporan Penelitian. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.
- Raza, H. & A. John. 2008. In Vitro Effects of Tea Polyphenols on Redox Metabolism, Oxidative Stress, and Apoptosis in PC12 Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1138(1): 358-365.
- Reygaert, W. C. 2014. The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in microbiology*, 5, 434.
- Rizal, M. H. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Penerbit Rineka Cipta. Bogor. 27-48.
- Rizal, M.A dan Herdis. 2008. Peranan Berbagai Jenis Gula dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Domba Garut. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 123- 130.
- Rizal, M., Herdis dan S. Insun. 2013. Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Mempertahankan Kehidupan dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Semen Beku Domba Garut. *Jurnal Veteriner*. Jakarta. 14(4): 437-443.
- Rochmi, S. E. and Sofyan, M. S. 2019. A Dilluent Containing Coconut Water, Fructose, and Chicken Egg Yolk Increases Rooster Sperm Quality at 50C. *Veterinary World* 12 (7) : 1116-1120.
- Rodiah, E., A. Yuliani, S. Drajat, dan C. Arman. 2015. Efektifitas Kinerja Pentoksifilin terhadap Kualitas dan Integrites Membran Plasma Utuh pada Sperma Sapi Bali Hasil Pemisahan dengan Menggunakan Albumin. *Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Mataram*. Lombok. 1(1): 61-64.
- Saili, T. dan S. Rahadi. 2014. Membran plasma utuh sprmatozoa epididimis kambing perranakan ettawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 1(1): 79-87.
- Sari, E. M., S. Nur, M. Mulkan, G. Gholib, C. N. Thasmi, dan T. N. Siregar. 2021. Pengaruh Pemberian PGF2 α Sebelum Koleksi terhadap Peningkatan Kualitas Semen dan Level Testosteron Sapi Aceh. *Jurnal Agripet*, 21(1).
- Septiani, D. dan E. M. Effendi, 2017. Penyimpanan Spermatozoa pada Suhu Preservasi dan Berbagai Pengencer Semen terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa. *Ekologia*, 17(2), 18-23.
- Shuang, S. O. N. G., Y. W. Huang, T. I. A. N. Yang, W. A. N. G. Xuan-Jun, & J. Sheng. 2014. Mechanism of action of (–)-epigallocatechin-3-gallate: auto- oxidation-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in Jurkat cells. *Chinese journal of natural medicines*, 12(9), 654-662.
- Shukla, A. S., A. K. Jha, R. Kumari, K. Rawat, S. Syeda, & A. Shrivastava. 2018. Role of Catechins in Chemosensitization. *Role of Nutraceuticals in Chemoresistance to Cancer* (1st ed., Vol. 2). Elseiver Inc. 169-198.

- Sholikah, N. U., N. Isnaini, A. P. Anugra Yekti, dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh penggantian Bovine Serum Albumin (BSA) dengan putih telur pada pengencer CEP-2 terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole pada suhu penyimpanan 3-5°C.
- Slomianka, L. 2009. Blue Histology – Male Reproductive. School of Anatomy and Human Biology. The University of Western Australia.
- Soenardiraharjo, B. S., M. Mafruchati, Widjiati dan E. M. Luqman. 2011. Buku Ajar Embriologi. Airlangga University Press. Surabaya.
- Somantri, R. dan K. Tantri. 2011. Kisah dan Khasiat The. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Subhandiawan, H. 2016. Persamaan laju pertumbuhan domba lokal jantan dan betina umur 1-12 bulan yang ditinjau dari panjang badan dan tinggi pundak (kasus peternakan domba di Kampung Nenggeng, Desa Neglasari, Kecamatan Darangdan, Kabupaten Purwakarta, Jawa Barat). *Students e- Journal*, 5(4).
- Suprianto. 2016. Kajian Aplikasi Teknologi Inseminasi Buatan Dalam Upaya Peningkatan Produktivitas dan Pendapatan Usaha Ternak Sapi Potong di Kabupaten Tasikmalaya. *Mimbar Agribisnis: Jurnal Pemikiran Masyarakat Ilmiah Berwawasan Agribisnis*. 1.3: 211-226.
- Suprayogi, T. W. and Susilowati, S. 2018. The effect of Cattle Seminal Plasma Crude Protein on the Cryopreservation of Goat Semen. *IJAS*. 8(4): 641-646.
- Susilawati, T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Susilowati, T., S. Hardijanto, W. Suprayogi, T. Sardjito, dan Hernawati. 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. ISBN 978-602-8967-01-3.
- Susilowati, S. dan T. Hernawati. 2011. Penambahan Insulin Like Growth Factor-I Complex dalam Pengencer Pembekuan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing pada Waktu Ekuilibrasi. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 5 No. 2.
- Susilowati, S., T. Sardjito, O. S. Widodo, R. Kurnijasanti, W. Wurlina, E. Safitri, & I. Mustofa. 2018. Effect of Green tea Extract Supplementation in the Semen Extender on Post-thaw Sperm Quality of Simmental Bulls. *Philipp. J. Vet. Med*. 55(2): 127-134.
- Suzuki T., M. Pervin, S. Goto, M. Isemura, Y. Nakamura. 2016. Beneficial Effects of Tea and the Green Tea Catechin Epigallocatechin-3-gallate on Obesity. *Molecules*. 2016: 21, 1305:1-13.
- Swari, W. R., E. K. Sabdoningrum, W. Wurlina, S. Susilowati, R. Kurnijasanti, dan E. Safitri. 2019. Pengaruh Penambahan Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Dalam Bahan Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Sapudi Yang Disimpan Pada Suhu Dingin. *Ovozoa Journal of Animal Reproduction*, 8(2), 122-126.
- Sudaryat, Y., M. Kusmiyati, C. R. Pelangi, A. Rustamsyah, dan D. Rohdiana. 2015. Aktivitas antioksidan seduhan sepuluh jenis mutu teh hitam (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Indonesia. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*, 18(2), 95-100.
- Suyadi, A., Rachmawati, dan N. Iswanto. 2012. Pengaruh α -Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang disimpan pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 22 (3) :1-8.
- Tiesnamurti S. dan S. A. Asmarasari. 2012. Pengelolaan dan Pemanfaatan Sumber Daya Genetik Domba Ekor Gemuk Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumber Daya Genetik di Indonesia: Manfaat Ekonomi untuk Mewujudkan Ketahanan Nasional. Puslitnang Peternakan Bogor.
- Yuliani, E. dan H. Y. Lukman. 2013. Aplikasi Sperma Sexing Berbasis Antioksidan terhadap Kualitas dan Integritas Membran serta Daya Fertilitas Induk Sapi Bali. Seminar

- Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Fakultas Peternakan. Universitas Mataram. Vol. 13, pp. 25-30.
- Vasan, S. 2011. Semen Analysis and Sperm Function Tests: How Much to Test? Indian Journal of Urology (IJU): Journal of The Urological Society of India. 27(1): 41.
- Wang, H., G. Provan, & K. Helliwell. 2003. The Functional Benefits of Flavonoids: The Case of Tea. In I. Johnson and G. Williamson (Eds.), *Phytochemical Functional Foods*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, pp. 128-159.
- Woli, S. L., E. D. Kusumawati, dan A. T. N. Krisnaningsih. 2017. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ayam Kampung pada Suhu 5°C Menggunakan Pengencer dan Lama Simpan yang Berbeda. Jurnal Sains Peternakan 5(2): 138-144.