

Peningkatan Kualitas *Post Thawing* Spermatozoa Epididimis Sapi Dengan Suplementasi *Catechin* Sebagai Antioksidan Pada Pengencer Semen

(Improvement Of Post Thawing Cow Epididymal Spermatozoa Quality By Catechine Supplementation As Antioxidant On Cement Dilution)

Agung B.¹, Handang W.¹, dan M. Mirandy P.S.²

¹Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

²Pascasarjana Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

E-mail :

Abstrak

Kualitas spermatozoa *post thawing* menjadi faktor penting keberhasilan proses fertilisasi pada Inseminasi Buatan pada sapi. Keberhasilan fertilisasi akan berpengaruh kepada *pregnancy rate*. Salah satu kematian sel yang diakibatkan oleh *Reaction Oxygen Species* (ROS) diduga dapat merangsang kejadian apoptosis eksogenik yang akan mengurangi kualitas spermatozoa sehingga diperlukan satu zat yang dapat menekan ROS sebagai antioksidan. *Catechin* dikenal sebagai antioksidan pada sel yang mampu mengurangi kematian akibat ROS, sehingga diharapkan dapat bekerja pada proses pembekuan maupun thawing spermatozoa yang kemungkinan mengakibatkan kematian sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek penambahan *catechin* dari ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 0,05%, 0,1% dan 0,15% pada pengencer Tris-kuning telur untuk meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis sapi yang dikoleksi secara *in vitro*. Metode koleksi spermatozoa dilakukan dengan mencacah epididimis sapi pada NaCl fisiologis ditambah antibiotik. Pengencer Tris-Kuning telur dengan konsentrasi *catechin* yang berbeda ditambahkan ke dalam spermatozoa. Evaluasi motilitas dan prosentase hidup dilakukan secara mikroskopik. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa motilitas dan prosentase hidup pada pengencer *catechin* 0,05% , 0,1% dan 0,15% secara berturut-turut (7,5%; 27,25%), (12,5%; 31,75%) dan (20%; 41%) mempunyai angka yang lebih tinggi disbanding kontrol (5%; 26,5%) pada semua konsentrasi. Kesimpulan penelitian adalah penambahan *catechin* dari ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 0,05%, 0,1% dan 0,15% pada pengencer Tris-kuning telur, mampu meningkatkan motilitas dan prosentase hidup spermatozoa epididimis sapi *post thawing*.

Kata Kunci : spermatozoa, epididimis sapi, antioksidan, catechin, *post thawing*

Abstract

The quality of post-thawing spermatozoa become an important factor in the success of the process of fertilization artificial insemination in cattle. The successful of fertilisation will influence the pregnancy rate. One of the cell death caused by Oxygen Reaction Species (ROS) is considered to stimulate apoptosis exogenic factors will reduce the quality of sperm. In this object the substance that can suppress is ROS as an antioxidant. Catechine are known as antioxidants in cells capable of reducing deaths from ROS, which is expected to occur on freezing and thawing of spermatozoa that may result in cell death. The purpose of this study was to determine the effect of the addition of catechine from green tea extract with a concentration of 0.05%, 0.1% and 0.15% in Tris-egg yolk diluents to improve the quality of bovine epididymal spermatozoa which collected *in vitro*. Collection of epididymis spermatozoa have done by media on physiological NaCl plus antibiotics. Tris-yolk diluents with different concentrations of catechine were added to the spermatozoa. Evaluation of motility and percentage of live had performed microscopically at the laboratory of reproduction technology. The results of this study were indicated that the motility and the percentage living on media with catechin 0.05%, 0.1% and 0.15% respectively were (7.5%, 27.25%), (12.5%; 31, 75%) and (20%, 41%) had a higher rate than the controls (5%, 26.5%) at all concentrations. The conclusion of this study is the addition of catechine from green tea extract with a concentration of 0.05%, 0.1% and 0.15% in Tris-egg yolk diluent, is increasing the motility and percentage of live and death cattle *post thawing* of epididymal spermatozoa.

Key words : Spermatozoa, epididymal, antioxidant, catechine, *post thawing*

Pendahuluan

Proses peningkatan populasi pada sapi perlu adanya usaha untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas keturunan. Pada era modern ini banyak

teknologi reproduksi yang diterapkan di masyarakat, salah satunya yaitu Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi Buatan merupakan metode untuk deposisi semen pada saluran reproduksi betina selain

dengan kawin alami menggunakan semen beku ataupun semen cair (Manafi, 2010).

Di Indonesia, sapi merupakan salah satu komoditi ternak utama, oleh karena itu Inseminasi Buatan (IB) pada sapi banyak diterapkan untuk meningkatkan produksi ternak. IB pada sapi memerlukan semen yang berkualitas baik untuk mendapatkan hasil yang maksimal, oleh karena itu perlunya inovasi baru untuk meningkatkan kualitas semen dengan penambahan antioksidan. Seperti semua sel yang hidup pada kondisi aerob, sel spermatozoa akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang merupakan produk normal dari aktivitas metabolisme (Lamirande *et al.*, 1997).

Menurut Moreira da Silva *et al* (2010) *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat mengakibatkan kerusakan sel dan kematian sel spermatozoa. Kejadian kematian sel dapat terjadi karena nekrosis maupun karena apoptosis. Dua mekanisme yang menyebabkan sel mati. ROS dispekulasikan dapat menyebabkan kejadian apoptosis. Berbagai proses apoptosis dapat terjadi karena faktor eksogenik dan endogenik.pada proses pembekuan dan thawing kemungkinan ada peristiwa apoptosis atau nekrosis yang terjadi sebagai suatu proses alami akibat perubahan suhu, media dan fisiologis. Catechine sebagai antioksidan diharapkan mampu mengurangi akibat buruk dari ROS tersebut sehingga dapat mengurangi kematian sel yang diharapkan dapat meningkatkan kualitas hidup sperma post thawing (Sato *et al.*, 2010 dan Awoniyi *et al.*, 2012).

Viabilitas dan fertilitas spermatozoa *post thawing* secara umum rendah dibandingkan dengan semen cair yang segar. Hal ini terjadi karena terjadi kerusakan spermatozoa selama proses pembekuan. Kerusakan yang terjadi diakibatkan oleh adanya stress osmosis, kerusakan secara oksidatif, *cold shock*, dan pembentukan Kristal es (Rahman *et al.*, 2012).

Teh Hijau, hasil pemrosesan dari daun teh (*Camelia sinensis*), mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Pholyphenol utama pada teh hijau antara lain epicatechin (EG), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), dan epigallocatechin gallate (EGCG) (Raza dan John, 2008). Senyawa Catechin dapat mengatasi adanya *superoxide*, radikal hidroksil, radikal peroksid, dan radikal bebas. Selain itu catechin meningkatkan efek antioksidan dibandingkan dengan antioksidan lain, antara lain *atocopherol* dan vitamin C dan E. Kemampuan melawan radikal bebas oleh catechin berhubungan dengan struktur kimia dari tiap komponen catechin, gallate teresterifikasi pada posisi 3 cincin C, gugus catechol (gugus 3,4-dihydroxyl) pada cincin B, dan

gugus hidroksil pada posisi 5 dan 7 cincin A. Catechin juga dapat melindungi sel dari proses peroksidasi lemak dan deaminasi DNA yang diinduksi oleh *Oxidative Stress* (OS) (Sutherland *et al.*, 2006).

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengkaji efek penambahan catechin pada pengencer pada metabolisme spermatozoa sebelum dilakukan proses pembekuan. Harapan dari penelitian ini yaitu dengan adanya catechin yang ada pada ekstrak daun teh hijau, dapat menghambat dan mencegah kerusakan sel spermatozoa yang diakibatkan oleh ROS. Dengan berkurangnya kematian sel maka akan dapat meningkatkan kualitas spermatozoa dan tingkat hidup spermatozoa *post thawing*. Selain itu diharapkan dapat meningkatkan kualitas spermatozoa, baik itu dari segi motilitas maupun tingkat hidup spermatozoa.

Pada saat ini, pemanfaatan spermatozoa epididimis baik segar maupun yang telah dibekukan untuk teknologi reproduksi seperti Inseminasi Buatan dan *In Vitro Fertilization* (IVF) sangat jarang dilakukan dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Menurut Hafez dan Hafez (2000), spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis telah memiliki kemampuan membuahi oosit sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulasi.. Saat ini epididimis sapi jantan yang dipotong kurang mendapat perhatian yang lebih dan hanya terbuang sia-sia.

Penelitian ini menggunakan spermatozoa yang berasal dari epididimis sapi yang dipotong. Upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis dapat sebagai alternative untuk menyelamatkan genetik unggul sapi yang sudah tidak memungkinkan lagi dikoleksi semennya dengan metode-metode seperti vagina buatan, tidak memberikan respon terhadap elektroejakulator, dan *massage*. Metode ini juga akan membantu dalam upaya menyelamatkan plasma nutfah hewan jantan genetik unggul yang mati mendadak atau karena dipotong karena faktor usia.

Penambahan pengencer sitrat kuning telur dan tris kuning telur dapat menjadi media pembekuan, sehingga semen dapat bertahan cukup lama (Bearden dan Fuquay,2004). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penambahan catechin dari ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 0,05%, 0,1% dan 0,15% pada pengencer Tris-kuning telur sebagai antioksidan untuk mengurangi *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Materi dan Metode

Materi

Pada penelitian ini digunakan kauda epididimis yang diambil dari testis sapi. Testis diperoleh dari sapi yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Giwangan Yogyakarta. Penelitian untuk evaluasi secara keseluruhan dilakukan di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Giwangan Yogyakarta.

Bahan yang digunakan adalah kauda epididimis sapi, PBS, Eosin-Negrosin, Aquabides, Cathecin, Pen-Strep, Gliserol, Asam Sitrat, Tris buffer-kuning telur, Fruktosa, dan NaCl Fisiologis.

Alat yang digunakan adalah *scalpel*, *blade*, pinset anatomis, gunting, cawan petri, *deck glass*, *object glass*, Bunsen, gelas ukur, labu Erlenmeyer, pipet, spuit, *stirrer*, nampan, lampu, etiket, *gloves*, *tissue*, mikroskop, dan kamera digital.

Metode

Koleksi dan penyimpanan testis

Pada penelitian ini digunakan 4 pasang testis sapi yang diperoleh setelah sapi tersebut disembelih di Rumah Pemotongan Hewan Giwangan. Setelah testis dikoleksi segera dibawa ke ruang evaluasi di Rumah Pemotongan Hewan Giwangan, Yogyakarta sebelumnya dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologis ditambah antibiotik.

Koleksi dan evaluasi spermatozoa

Kauda epididimis dicacah dengan *scalple blade* dan gunting di dalam sebuah cawan petri yang berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Disiapkan pengencer kontrol, pengencer 0,05% cathecin, pengencer 0,1% cathecin, dan pengencer 0,15% cathecin. Setelah itu melakukan evaluasi motilitas progresif spermatozoa dan viabilitas spermatozoa pada keempat kelompok spermatozoa.

Pembuatan pengencer Tris-kuning telur

Pembuatan pengencer Tris-kuning telur menggunakan buffer antibiotik yang berisi Tris (hidroxymethyl) aminomethan 3,87 gram, Asam sitrat 2,17 gram, fruktosa 1,56 gram, Penisilin 500.000 IU, Streptomisin 50 mg dan ditambah aquabides hingga volumenya mencapai 100 ml.

Bagian putih telur dipisahkan, kemudian dengan menggunakan spuit, kuning telur diambil bagian dalam kuning telur. Bahan pengencer secara keseluruhan yaitu dengan mencampur secara homogen antara buffer antibiotic sebanyak 73,6 ml, kuning telur 20 ml, dan gliserol 6,4 ml. Pada bahan pengencer dengan kandungan cathecin 0,05%,

dibuat dengan mencampur sebanyak 0,05 gram cathecin dalam 100 ml bahan pengencer. Kemudian pada pengencer dengan kandungan cathecin 0,1% dibuat dengan mencampur 0,1 gram cathecin dalam 100 ml bahan pengencer, sedangkan untuk pengencer dengan kandungan cathecin 0,15% dibuat dengan mencampur 0,15 gram cathecin dalam 100 ml bahan pengencer.

Evaluasi spermatozoa

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan meletakkan semen di atas *object glass* dan ditutup dengan *deck glass* kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali. Angka yang diberikan berkisar antara 0% sampai 100% dengan skala 5% (Rizal *et al.* 2005). Pengecatan spermatozoa menggunakan pewarna eosin negrosin dilakukan dengan meneteskan pewarna pada tepi *object glass* dan semen ditetaskan di atas *object glass* tersebut dengan perbandingan 1 : 1 kemudian diapus dengan ujung *object glass* yang lain dengan sudut kemiringan 45 dan difiksasi di atas api Bunsen. Viabilitas spermatozoa diukur dengan menghitung jumlah spermatozoa hidup dan spermatozoa mati. Spermatozoa yang berwarna merah terhitung mati dan spermatozoa yang tidak menyerap warna atau sedikit menyerap warna terhitung hidup. Persentase hidup spermatozoa diambil dari 100 spermatozoa yang terhitung (Rizal *et al.* 2005).

Analisis Hasil

Data yang diperoleh meliputi motilitas, dan prosentase hidup mati spermatozoa pada masing-masing kelompok pengencer. Data analisis dengan metode ANOVA. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji signifikansi ($P < 0,05$).

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Pada Tabel 1. diketahui bahwa motilitas dan prosentase hidup pada pengencer yang diberi *catechin* berbagai konsentrasi tidak mempunyai perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), dibandingkan dengan motilitas dan prosentase hidup pada kontrol. Rerata motilitas pada pengencer kontrol sebesar 5,00%; pengencer *catechin* 0,05% sebesar 7,50%; pengencer *catechin* 0,1% sebesar 12,5%; dan pengencer *catechin* 0,15% sebesar 20,00%. Rerata prosentase hidup ada pengencer kontrol sebesar 26,50%; pengencer *catechin* 0,05% sebesar 27,25%; pengencer *catechin* 0,1% sebesar 31,75%; dan pengencer *catechin* 0,15% sebesar 41,00%.

Tabel 1. Prosentase kualitas spermatozoa epididimis sapi dengan penambahan *catechin* berbagai konsentrasi pada pengencer.

Pengencer	Motilitas (%)	Hidup (%)
Kontrol	5,00	26,50
<i>Catechin</i> 0,05%	7,50	27,25
<i>Catechin</i> 0,1%	12,50	31,75
<i>Catechin</i> 0,15%	20,00	41,00

Pembahasan

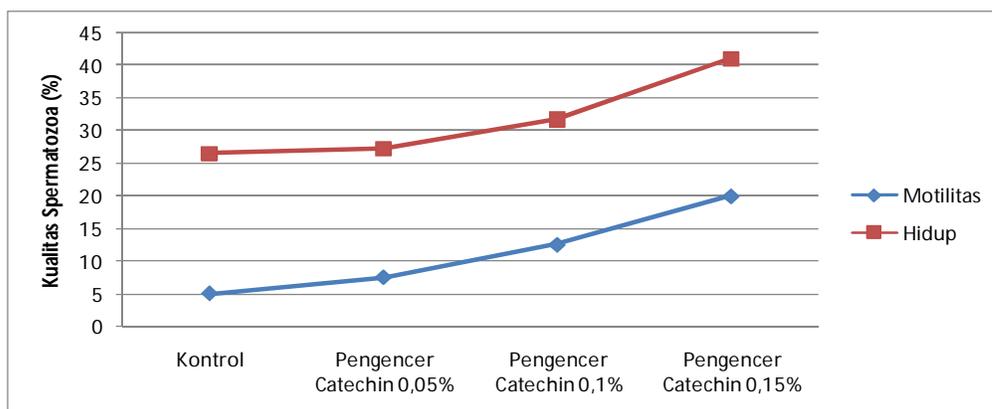
Peningkatan kualitas ini ditunjukkan dengan motilitas spermatozoa pada pengencer kontrol sebesar 5,00%; pengencer *catechin* 0,05% sebesar 7,50%; pengencer *catechin* 0,1% sebesar 12,5%; dan pengencer *catechin* 0,15% sebesar 20,00%. Lebih jelas terlihat pada Gambar 1 dalam grafik motilitas dan presentase hidup mati spermatozoa post thawing.

Penelitian ini sesuai dengan pendapat sebelumnya yang menyatakan bahwa motilitas spermatozoa bergantung pada suplai energy berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme akan berlangsung baik jika membrane sel dalam keadaan utuh. Sel yang rusak dapat dikurangi dengan adanya antioksidan tersebut. Hasil sampingan metabolisme spermatozoa dapat menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat mengakibatkan kerusakan sel dan kematian sel spermatozoa (Lamirande *et al* 2007).

Menurut Sutherland *et al* (2006), Proses pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat ditekan dengan zat aktif yang bernama *catechin*. Senyawa *Catechin* dapat mengatasi adanya *superoxide*, radikal hidroksil, radikal

peroksid, dan radikal bebas. Selain itu *catechin* meningkatkan efek antioksidan dibandingkan dengan antioksidan lain. Pada penelitian ini, dilihat dari rerata motilitas dan prosentase hidup mati spermatozoa, penambahan *catechin* cenderung meningkatkan motilitas dan prosentase hidup spermatozoa. Gambar 1 menunjukkan bahwa motilitas dan persentase hidup pada spermatozoa dengan pengencer *catechin* (0,15% ; 20%; 41%), rerata lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (5%; 26,5%). Hal ini dapat terjadi karena *catechin* mampu mencegah dan menghambat serangan oksidatif pada membrane sel. Sehingga kematian sel dapat dicegah, dan membrane sel tidak rusak dan dapat berfungsi dalam mengatur lalu lintas masuk dan keluar seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Gugus hidroksi dari senyawa *catechin* bertindak sebagai antioksidan yang mampu mengurangi produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Armoskaite, 2011).

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa penambahan *Catechin* dari ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 0,05%, 0,1% dan 0,15% meningkatkan motilitas dan prosentase hidup mati spermatozoa epididimis sapi secara absolut.



Gambar 1. Motilitas dan persentase hidup spermatozoa dengan berbagai pengencer *catechin*

Kesimpulan

Pemberian *Catechin* dari ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 0,05%, 0,1% dan 0,15% mampu meningkatkan motilitas dan prosentase hidup mati spermatozoa epididimis sapi secara absolut. Catechine secara efektif kemungkinan dapat mengurangi kematian sel karena ROS sehingga dapat mengoptimalkan proses metabolisme post thawing dari spermatozoa.

Ucapan Terimakasih

Pada kesempatan ini kami ucapkan terimakasih kepada Bidang Peternakan Propinsi Daerah Istimewa Yogyakarta atas bantuan fasilitas, perlengkapan dan tenaga selama penelitian ini. Kepada seluruh anggota tim penelitian dari FKH UGM atas kerja keras dan kerjasama yang baik sehingga dapat diselesaikannya penelitian ini dan semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah mendukung lancarnya penelitian ini.

Daftar Pustaka

Armoskaite, V., Ramanauskienė, K., Maruska, A., Razukas, A., Dagilyte, A., Baranauskas, A., dan Breidis, V. 2011. *The analysis of quality and antioxidant activity of green tea extracts*. Journal of medicinal Plants Research. Vol 5 (5) : pp 811-816.

Awoniyi DO, Aboua YG, Marnewick J, Brooks N. 2012 *The effects of rooibos (Aspalathus linearis), green tea (Camellia sinensis) and commercial rooibos and green tea supplements on epididymal sperm in oxidative and Wellness Sciences*. Cape Peninsula University of Technology, Bellville 7535, South Africa. stress-induced rats. Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health *Phytother Res.* 2012 Aug;26(8):1231-9. doi: 10.1002/ptr.3717.

Bearden, J.H. dan Fuquay, J.W. 2004. *Applied Animal Reproduction*, 6th edition. Prentice Hall, New Jersey.

Hafez, E.S.E. dan B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal*, 7th edition. Baltimore : Lippicott Williams and Wilkins.

Sato, K., Sueoka, K., Tanigaki, R., Tajima, H., Nakabayashi, A., Yoshimura, Y. dan Hosoi, Y. 2010. *Green tea extracts attenuate doxorubicin-induced spermatogenic disorders in conjunction with higher telomerase activity in mice*. J Assist Reprod Genet.; 27(8): 501-508.

Lamirande, de, E., Hong, J., Zini, A., Kodama, H., dan Gagnon, C. 1997. *Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology*. Reviews of Reproduction. Vol 2 :48-54.

Manafi, M. 2010. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Intech : India

Rahman, H.J., Ahmad, N., Rahman, N., Waheed, S., Ahmad, M., Younis, M., dan Ahmad, T. 2012. *Effect of Different Levels of Pigeon Egg Yolk in Extenders on the Post-Thaw Semen Quality of Sahiwal Bulls*. Pak.Vet.J.32 (2) : 315-318.

Raza, H. dan John, A. 2008. *In Vitro Effects of Tea Polyphenols on Redox Metablism, Oxidative Stress, and Apoptosis in PC12 Cells*. Ann.N.Y.Acad.Sci.1138 : 358-365

Rizal, M., Toelihere, M.R., Tuty, L., Yusuf, Purwantara, B., Situmorang, P.Z. 2005. *Pengaruh Waktu Penyimpanan Epididymis pada Suhu 5°C terhadap Kualitas Spermatozoa Epididymis Domba Garut*. Jvet. 5:3.

Sutherland, B.A., Rahman, R.M.A., Appleton, I. 2006. *Mechanisms of Action of Green Tea Catechins, with a Focus on Ischemia-induced Neurodegeneration*. Journal of Nutritional Biochemistry.17:291-306.

Vilakazi, D.M. 2003. *Factor affecting the quality of semen of A.I. dairy bulls in South Africa*. Faculty of Natural and Agricultural Sciences University of Pretoria. South Africa.