



Perbandingan Pengaruh Penambahan Antioksidan Alami dan Sintetis dalam Pengencer CEP Semen Beku Sapi Bali

Comparison of Natural and Synthetic Antioxidant Supplementation in CEP Extender for Bali Cattle Frozen Semen

Sherly Intan Eka Putri^{1*}, Nur Ducha¹, Erlix Rakhmad Purnama¹,
Wiwied Sawitri²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Kampus 1 Unesa Jl. Ketintang, Surabaya, Indonesia, 60231

²Balai Besar Inseminasi Buatan, Jl. BBIB, Ngujung, Toyomarto, Singosari, Malang, Indonesia, 65153

ABSTRAK

Spermatozoa sapi Bali rentan terhadap kerusakan akibat stres oksidatif selama kriopreservasi, yang dapat menurunkan kualitas semen beku. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh penambahan antioksidan alami (ekstrak teh hijau) dan sintetis (*glutathione*) pada pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP) terhadap kualitas semen beku sapi Bali. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam ulangan, pengencer CEP dasar (kontrol), CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau. Evaluasi kualitas spermatozoa dilakukan saat *before freezing* dan *post thawing*, meliputi motilitas menggunakan *Computer-Assisted Semen Analysis* (CASA), viabilitas menggunakan pewarna eosin-nigrosin dan integritas membran dan uji *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan antioksidan secara signifikan meningkatkan kualitas spermatozoa dibanding dengan kontrol ($p < 0.05$). CEP yang ditambahkan 0.15% ekstrak teh hijau memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan *post-thawing* motilitas ($49.2 \pm 2\%$), viabilitas ($67.4 \pm 2.6\%$), dan integritas membran ($62.1 \pm 1.9\%$). Kesimpulannya, ekstrak teh hijau dan *glutathione* secara signifikan lebih efektif dibandingkan kontrol, dengan ekstrak teh hijau cenderung memberikan nilai tertinggi pada motilitas, viabilitas, dan integritas membran *post-thawing*.

Kata kunci: Antioksidan, teh hijau, *glutathione*, semen beku, sapi Bali

ABSTRACT

Bali cattle spermatozoa are highly vulnerable to oxidative stress during cryopreservation, which can compromise frozen semen quality. This study aimed to evaluate the effect of adding natural (green tea extract) and synthetic *glutathione* antioxidants to *Cauda Epididymal Plasma* (CEP) diluents on the quality of frozen Bali cattle semen. A Completely Randomized Design (CRD) with three treatments and six replications was applied, CEP diluent (control), CEP + 0.75 mM *glutathione*, and CEP + 0.15% green tea extract. Sperm quality was evaluated before freezing and post thawing, including motility using *Computer-Assisted Semen Analysis* (CASA), viability using eosin-nigrosin staining, and membrane integrity using the *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). The results showed that antioxidant supplementation significantly improved sperm quality compared with the control ($p < 0.05$). CEP supplemented with 0.15% green tea extract exhibited the best performance in maintaining after thawing motility ($49.2 \pm 2\%$), viability ($67.4 \pm 2.6\%$), and membrane integrity ($62.1 \pm 1.9\%$). In conclusion, green tea extract and *glutathione* were significantly more effective than the control, with green tea extract tending to provide the highest values for motility, viability, and membrane integrity after thawing.

Keywords: Antioxidant, green tea extract, *glutathione*, frozen semen, Bali cattle

***Corresponding Author:**
Sherly Intan Eka Putri,
Jurusan Biologi, Universitas Negeri Surabaya;
sherlyintan122@gmail.com

Diterima: 04-09-2025
Disetujui: 22-12-2025
Diterbitkan: 27-12-2025

Kutipan: Putri, S.I.E., Ducha, N., Purnama, E.R., Sawitri, W. (2025). Perbandingan Pengaruh Penambahan Antioksidan Alami dan Sintetis dalam Pengencer CEP Semen Beku Sapi Bali. *Jurnal Ilmiah AgriSains*, 26(3), 184-195. <https://doi.org/10.22487/jiagrisains.v26i3.2025.184-195>

PENDAHULUAN

Sapi Bali adalah sapi asli Indonesia yang berpotensi sebagai penghasil daging, dengan kontribusi sekitar 26,9% terhadap kebutuhan daging nasional (Fuah *et al.*, 2020). Sapi ini banyak dipelihara karena kebutuhan pakannya yang relatif sedikit namun memiliki tingkat produktivitas yang tinggi (Azzahra *et al.*, 2025). Untuk mempertahankan populasi sekaligus meningkatkan mutu genetik, teknologi reproduksi seperti Inseminasi Buatan (IB) banyak diterapkan dengan tingkat keberhasilan mencapai 60–70% (Kuswanto *et al.*, 2023). Keberhasilan IB sendiri dipengaruhi oleh kondisi ternak, keterampilan peternak, serta kualitas semen yang digunakan (Argus & Suhra, 2023).

Kualitas semen sapi sering mengalami penurunan akibat cold shock dan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) selama proses pembekuan (Fitri *et al.*, 2025; Pramesti & Ducha, 2023). Kondisi tersebut menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara ROS dan sistem pertahanan antioksidan endogen, sehingga dapat merusak struktur spermatozoa (Tamargo *et al.*, 2024). Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses kriopreservasi dapat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa hingga 50% setelah pencairan (Khalil *et al.*, 2018). Meskipun spermatozoa memiliki sistem pertahanan berupa enzim antioksidan endogen, mekanisme ini tidak cukup kuat untuk menyeimbangkan produksi ROS yang berlebih (Fitri *et al.*, 2025). Oleh sebab itu, penambahan antioksidan dalam pengencer diperlukan untuk menangkal pembentukan ROS (Wijayanti *et al.*, 2023).

Antioksidan adalah komponen yang umum ditambahkan dalam pengencer. Fungsi utama dari antioksidan adalah melindungi sel dari kerusakan struktural dengan menghilangkan metabolit oksigen reaktif (Partyka & Nizański, 2021). Antioksidan sendiri terbagi menjadi dua jenis, yaitu alami dan sintetis. Contoh antioksidan alami adalah ekstrak teh hijau dan diketahui mampu menetralkan ROS dan mencegah kerusakan DNA akibat stres oksidatif (Alqawasmeh *et al.*, 2021). Sementara itu, contoh antioksidan sintetis adalah *glutathione*, diketahui dapat menjaga keseimbangan redoks intraseluler dengan cara menetralkan radikal bebas, mereduksi hidroperoksida, serta melindungi lipid, protein, dan DNA dari kerusakan oksidatif (Zou *et al.*, 2021).

Meskipun berbagai penelitian telah membahas penambahan antioksidan dalam pengencer semen, perbandingan langsung antara antioksidan alami dan sintetis pada pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP) semen beku Sapi Bali masih terbatas. Berdasarkan beberapa hal itu, penelitian ini dilakukan untuk membandingkan pengaruh penambahan ekstrak teh hijau 0,15% dan *glutathione* 0,75 mM terhadap kualitas spermatozoa Sapi Bali pasca pembekuan.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian berlangsung pada bulan September hingga Oktober 2024 bertempat di Laboratorium Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang.

Materi Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu bahan dasar CEP, ekstrak teh hijau, *glutathione*, semen sapi Bali segar, zat warna eosin negrosin, dan larutan host. Sementara alat yang digunakan adalah mikroskop, *waterbath*, tabung nitrogen, *object glass*, *cover glass*, *hand tally counter*, spuit, dan mikropipet. Pengencer CEP terdiri dari NaCl 15 mmol/L; KCl 7.0 mmol/L; CaCl₂·2H₂O 3.0 mmol/L; MgCl₂·6H₂O 63.0 mmol/L; NaHCO₃ 11.9 mmol/L; NaH₂PO₄ 8.0 mmol/L; KH₂PO₄ 20.0 mmol/L; fruktosa 55 mmol/L;

sorbitol 1.0 g/L; BSA 2.0 g/L; Tris 133.7 mmol/L; penisilin 1000 IU; streptomisin 1 g; asam sitrat 42.6 mmol/L (Ducha, 2018). Bahan pengencer CEP dihomogenkan menggunakan air injeksi secara aliquots kemudian disaring menggunakan 0.22 μ m membran Millipore. Hasil penyaringan ditambahkan kuning telur sebanyak 20% dari total pengencer. Pengencer dibagi menjadi tiga untuk ditambahkan ekstrak teh hijau sebanyak 0.15%, *glutathione* sebesar 0.75 mM, dan sebagai kontrol dengan tanpa tambahan apapun. Kemudian pengencer diendapkan selama 3 hari hingga terpisah supernatan dan endapannya. Supernatan dipisahkan menggunakan spuit digunakan sebagai pengencer (Fitri et al., 2025).

Metode Penelitian

Sampel semen diperoleh dari pejantan sapi Bali berusia 13 tahun dengan menggunakan *artificial vagina*. Setelah ditampung, semen diuji secara mikroskopis dan makroskopis. Pengujian makroskopis meliputi pengujian yang melibatkan volume, pH, warna, bau, dan konsistensi. Sementara itu, pengujian mikroskopis melibatkan motilitas, viabilitas, dan integritas membran.

Semen segar diencerkan menggunakan pengencer CEP. Pengenceran yang dilakukan adalah A1, A2, dan pengenceran B. Pengenceran A1 ditambahkan dengan perbandingan 1:1, sementara pengenceran A2 berdasarkan rumus yang telah ditentukan. Setelah itu, semen disimpan dalam kulkas bersuhu 5°C dan ditunggu sampai suhu turun hingga 4-5°C sebelum dilanjutkan ke pengenceran B. Pada pengencer B, pengencer ditambahkan gliserol sebanyak 13%. Pembekuan semen dimulai dengan proses *post freezing*, yaitu penurunan suhu secara bertahap dari 5°C menjadi -140°C selama 7 menit menggunakan mesin DigitCool. Selanjutnya, proses pembekuan menggunakan nitrogen cair dengan suhu -196°C (Fitri et al., 2025).

Pengujian semen cair dilakukan pada saat *before freezing* atau setelah penambahan gliserol 13% dan belum dibekukan. Pengujian *before freezing* dapat digunakan untuk optimasi kualitas dasar sperma sebelum pembekuan (Androni et al., 2021). Lalu pengujian *post thawing* dilakukan pada straw beku yang dihangatkan dalam *waterbath* dengan suhu 37°C selama 30 detik. Pengujian *post thawing* bertujuan menilai kualitas semen setelah pembekuan serta membandingkan efektivitas antioksidan sebagai krioprotektan. Pengujian dilakukan ketika *before freezing* dan *post thawing* meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran.

Uji motilitas menggunakan mikroskop perbesaran 400x. Data motilitas spermatozoa diperoleh dengan menghitung pergerakan spermatozoa dari lima lapang pandang yang berbeda dan dihitung menggunakan skala 0-100% (Prihantoko et al., 2020). Semen beku dicairkan kembali pada suhu 37°C sampai 38°C selama 30 detik dan harus menunjukkan motilitas progresif spermatozoa $\geq 40\%$ sebagai persyaratan mutu (BSN, 2024).

Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan meneteskan semen diatas *object glass* dan ditambahkan pewarna eosin nigrosin lalu dibuat apusan tipis. Perbesaran mikroskop yang digunakan adalah perbesaran 400x. Kepala spermatozoa yang berwarna ungu-merah menandakan sel telah mati, sedangkan kepala spermatozoa yang tetap tidak terwarnai menunjukkan bahwa spermatozoa masih hidup (Ducha et al., 2025).

Uji integritas membran menggunakan *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOST) sebagai parameter penilaian untuk mengevaluasi kelayakan membran plasma spermatozoa (Ducha et al., 2025). Larutan HOST terdiri dari 1.3 g fruktosa dan 0.7 trisodium sitrat dalam 100 ml akuades (Ducha et al., 2025). Sampel semen sebanyak 50 μ L dilarutkan kedalam 1000 μ L larutan HOST. Sampel kemudian dihangatkan di *waterbath* selama 30 menit sebelum diamati di mikroskop dengan perbesaran 400x. Ekor spermatozoa yang melingkar menandakan bahwa membran plasma masih utuh, sedangkan ekor yang lurus

menunjukkan bahwa membran plasma spermatozoa telah rusak (Mujahidurrohman *et al.*, 2023).

Analisis Data

Data dianalisis dan diolah berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam ulangan, yaitu: P1 = semen + gliserol 13% + CEP (kontrol), P2 = semen + gliserol 13% + CEP + *glutathione* 0,75 mM, dan P3 = semen + gliserol 13% + CEP + ekstrak teh hijau 0,15%. Penggunaan gliserol 13% mengacu pada penelitian Fitri *et al.* (2025). Data yang diperoleh diolah untuk dilakukan pengujian normalitas dan homogenitas untuk ditentukan data distribusinya. Data yang termasuk normal dan homogen akan dilanjutkan ujinya menggunakan metode analisis *One Way ANOVA*. Uji duncan dilakukan apabila perlakuan berpengaruh signifikan ($p < 0.05$). Uji duncan digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang berbeda secara signifikan. Seluruh data diolah menggunakan SPSS 23 pada Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Semen Segar

Pengujian semen Sapi Bali dilakukan pada saat semen segar dan ketika proses pengenceran. Pengujian semen segar dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis (Ducha *et al.*, 2025). Hasil dari pengujian semen segar sesuai dengan persyaratan BSN (2024) dengan minimum motilitas $\geq 70\%$ dan abnormalitas $\leq 20\%$.

Tabel 1. Evaluasi kualitas semen segar sapi Bali

Parameter Makroskopis	Nilai Rataan $\pm$ Standar Deviasi
Warna	Putih susu
pH	6.7 ± 0.1
Konsistensi	Pekat
Volume (ml)	8 ± 1.4
Konsentrasi (juta/ml)	1469 ± 570.6
Abnormalitas	10.8 ± 1.13
Motilitas individu (%)	70 ± 2.8
Viabilitas (%)	83.4 ± 2.7
Integritas membran	77 ± 1.4

Sumber: Data Primer (2024)

Hasil evaluasi kualitas semen segar sapi Bali secara makroskopis diperoleh bahwa semen sapi Bali memiliki volume sebanyak 8 ± 1.4 ml, lebih banyak dibanding penelitian yang dilakukan oleh Fazrien *et al.* (2020) yang berkisar antara 5.5 - 6.9 ml. Semen berwarna putih susu menunjukkan kondisi yang normal. Warna semen sapi yang baik adalah warna susu, krem keputihan, atau putih kekuningan (Brillianti *et al.*, 2021).

Potensial Hidrogen (pH) yang diperoleh dari semen segar bernilai 6.7 ± 0.1 termasuk kedalam rentang normal (Ducha *et al.*, 2025). Kekentalan semen mencerminkan konsentrasi spermatozoa, di mana semen yang lebih kental umumnya memiliki jumlah spermatozoa lebih tinggi (Ducha *et al.*, 2025; Tethool *et al.*, 2022).

Pengujian mikroskopis diperoleh data konsentrasi 1469 ± 570.6 juta/ml menggunakan spektrofotometer. Hasil motilitas semen segar $70\% \pm 2.8$ dan abnormalitas $10.8 \pm 1.13\%$, yang berarti semen segar dapat dilanjutkan prosesnya menjadi semen beku sesuai dengan BSN (2024). Nilai motilitas semen segar yang diperoleh lebih rendah dibanding penelitian Fitri *et al.* (2025) yang memiliki persentase motilitas 72.2%.

Viabilitas spermatozoa adalah penilaian spermatozoa berdasarkan total jumlah spermatozoa yang hidup dalam satuan persen (Sugiantini *et al.*, 2023) dan menghasilkan

nilai viabilitas semen segar sebesar $83.4 \pm 2.7\%$. Nilai viabilitas yang diperoleh termasuk dalam kategori baik, sesuai dengan penelitian Fazrien *et al.* (2020) dengan hasil nilai viabilitas semen segar Sapi Bali adalah berkisar antara 80.1% hingga 83.8%. Uji integritas membran semen segar menghasilkan nilai $77 \pm 1.4\%$ yang mana lebih tinggi dibanding semen segar pada penelitian Fitri *et al.* (2025) yang menghasilkan nilai 65.71 ± 8.34 .

Pengujian Motilitas Spermatozoa

Pengujian motilitas semen Sapi Bali juga dilakukan pada saat *before freezing* dan *post thawing* dengan perlakuan pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau. Hasil pengamatan motilitas dapat dilihat di Tabel 2.

Tabel 2. Hasil persentase rata-rata $\pm$ standar deviasi motilitas spermatozoa Sapi Bali dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau.

Rerata Persentase Motilitas (%)	Perlakuan		
	CEP	CEP + 0.75 mM <i>glutathione</i>	CEP + 0.15% ekstrak teh hijau
<i>Before freezing</i>	60.8 ± 2^a	65.8 ± 2^b	67.3 ± 2.6^b
<i>Post thawing</i>	40.8 ± 2^a	47.5 ± 2.7^b	49.2 ± 2^b

Keterangan: Notasi abjad yang berbeda pada tabel menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan ($P > 0.05$). Notasi a merupakan motilitas terendah, dan begitupun seterusnya.

Berdasarkan Tabel 2, terdapat tren yang konsisten pada motilitas spermatozoa baik saat *before freezing* maupun *post thawing*. Tren tersebut menunjukkan bahwa penambahan antioksidan, baik *glutathione* maupun ekstrak teh hijau, secara konsisten meningkatkan motilitas spermatozoa dibandingkan dengan kontrol tanpa antioksidan. Pada tahap *before freezing*, motilitas tertinggi diperoleh pada perlakuan CEP + 0,15% ekstrak teh hijau ($67,3 \pm 2,6\%$), diikuti CEP + 75 mM *glutathione* ($65,8 \pm 2\%$), dan terendah pada CEP tanpa penambahan antioksidan ($60,8 \pm 2\%$). Pola yang sama juga tampak pada tahap *post thawing*, di mana ekstrak teh hijau memberikan motilitas tertinggi ($49,2 \pm 2\%$), diikuti *glutathione* ($47,5 \pm 2,7\%$), serta terendah pada kontrol ($40,8 \pm 2\%$).

Hasil uji ANOVA memperlihatkan adanya pengaruh signifikan ($P < 0.05$) antar perlakuan dengan dan tanpa tambahan antioksidan. Uji lanjutan Duncan menegaskan bahwa penambahan 0.15% ekstrak teh hijau memberikan rata-rata motilitas yang lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Temuan ini sejalan dengan tren pada Tabel 2, yang menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau memberikan efek protektif terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa selama proses pembekuan dan pencairan dengan perbedaan signifikan dibandingkan pengencer tanpa antioksidan, tetapi tidak berbeda nyata dengan pengencer yang mengandung *glutathione*.

Motilitas spermatozoa yang lebih tinggi pada perlakuan penambahan ekstrak teh hijau dibandingkan *glutathione* diduga berkaitan dengan kandungan antioksidan alami yang lebih kompleks dan potensi aktivitas biologinya yang lebih kuat. Ekstrak teh hijau mengandung kelompok polifenol khususnya epigallocatekin galat (ECGC), yang mampu mendonasikan elektron kepada ROS sehingga dapat menghambat proses peroksidasi lipid pada membran spermatozoa yang terjadi selama proses pembekuan (Susilowati *et al.*, 2021). Dengan demikian, integritas membran dan fungsi mitokondria spermatozoa dapat dipertahankan sehingga pergerakan dan motilitasnya tetap optimal.

Sementara itu, *glutathione* juga merupakan antioksidan kuat, dapat menstabilkan struktur membran, mempertahankan fluiditas lipid, serta mencegah kerusakan protein dan DNA akibat stres oksidatif (O'Flaherty & Scarlata, 2022). Dengan demikian, spermatozoa dapat mempertahankan fungsi motilitasnya dengan lebih baik. Namun, aktivitas *glutathione* bergantung pada aktivitas enzim dan kondisi redoks dalam sel. Selama proses kriopreservasi, terjadi penurunan aktivitas enzimatis akibat suhu rendah (Kabir & Ju, 2023),

diduga dapat mengurangi efektivitas *glutathione* dalam menetralkan ROS dibandingkan dengan ekstrak teh hijau yang aktivitas antioksidannya bekerja secara langsung tanpa memerlukan sistem enzimatis.

Motilitas spermatozoa terendah pada perlakuan tanpa tambahan antioksidan disebabkan oleh ROS selama proses kriopreservasi (Fleming & Thomson, 2025). Proses kriopreservasi memicu stress oksidatif (Cao et al., 2022), yang dapat menyerang bagian membran plasma yang kaya akan asam lemak (Wang et al., 2025). Tanpa adanya antioksidan, ROS berlebih yang menyebabkan stress oksidatif dapat memicu peroksidasi lipid pada membran sel spermatozoa, kerusakan DNA, dan inaktivasi enzim-enzim penting (Bader et al., 2020). Oleh karena itu, perlakuan tanpa tambahan antioksidan menghasilkan motilitas terendah dibanding perlakuan dengan tambahan antioksidan.

Pengujian Viabilitas Spermatozoa

Pengujian Hasil persentase rata-rata $\pm$ standar deviasi viabilitas spermatozoa Sapi Bali dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau viabilitas semen Sapi Bali dilakukan pada saat *before freezing* dan *post thawing* dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau. Hasil pengamatan viabilitas dapat dilihat di Tabel 3.

Tabel 3. Hasil persentase rata-rata $\pm$ standar deviasi viabilitas spermatozoa Sapi Bali dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau.

Rerata Persentase Viabilitas (%)	Perlakuan		
	CEP	CEP + 0.75 mM <i>glutathione</i>	CEP + 0.15% ekstrak teh hijau
<i>Before freezing</i>	70.4 $\pm$ 1.1 ^a	76.5 $\pm$ 1.7 ^b	78.9 $\pm$ 0.7 ^c
<i>Post thawing</i>	57.4 $\pm$ 2 ^a	65.4 $\pm$ 2.3 ^b	67.4 $\pm$ 2.6 ^b

Keterangan: Notasi abjad yang berbeda pada tabel menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan ($P > 0.05$). Notasi a merupakan viabilitas terendah, dan begitupun seterusnya

Berdasarkan Tabel 3, terlihat bahwa viabilitas spermatozoa menurun baik saat *before freezing* maupun *post thawing*. Perlakuan dengan penambahan 0.15% ekstrak teh hijau menunjukkan viabilitas paling tinggi *before freezing*, yaitu 78.9 $\pm$ 0.7%, sedangkan perlakuan tanpa antioksidan memiliki nilai terendah, yaitu 70.4 $\pm$ 1.1%. Pada saat *post thawing*, viabilitas tertinggi tetap ditunjukkan oleh ekstrak teh hijau (67.4 $\pm$ 2.6%), diikuti *glutathione* (65.4 $\pm$ 2.3%), dan yang terendah pada pengencer tanpa antioksidan (57.4 $\pm$ 2%).



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa Sapi Bali dengan perbesaran 400x.

Deskripsi: [a] Pengencer CEP; [b] Pengencer CEP + 0.75 mM *glutathione*; [c] CEP + 0.15% ekstrak teh hijau; (D) spermatozoa terwarnai; (L) spermatozoa tidak terwarnai

Penilaian viabilitas dilakukan dengan pewarnaan eosin-nigrosin (Gambar 1), di mana spermatozoa hidup ditandai dengan kepala yang tidak terwarnai (notasi L), sedangkan spermatozoa mati memiliki kepala berwarna keunguan (notasi D). Hasil uji statistik

menunjukkan bahwa saat *before freezing*, ketiga perlakuan berbeda nyata satu sama lain. Namun setelah pencairan, perbedaan yang nyata hanya terlihat antara pengencer tanpa antioksidan dan kedua perlakuan dengan antioksidan. Hal ini mengindikasikan bahwa baik ekstrak teh hijau maupun *glutathione* mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa dengan efektivitas yang relatif sama pada tahap *post thawing*.

Viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi pada perlakuan CEP dengan penambahan antioksidan dibandingkan pengencer tanpa antioksidan menunjukkan bahwa keberadaan senyawa antioksidan berperan penting dalam melindungi sel sperma dari kerusakan akibat stres oksidatif selama kriopreservasi. Kriopreservasi bertanggung jawab terhadap pembentukan ROS berlebih seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil, yang dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif, kerusakan membran sel, serta peroksidasi lipid (Benko et al., 2022). Kerusakan ini menyebabkan disfungsi mitokondria dan akhirnya menyebabkan kematian sel sperma (Mai et al., 2024). Penambahan antioksidan kedalam pengencer berfungsi menetralkan ROS tersebut, sehingga struktur dan fungsi membran dapat dipertahankan (Qamar et al., 2023). Dengan demikian, jumlah spermatozoa hidup tetap tinggi setelah thawing.

Ekstrak teh hijau mengandung berbagai senyawa polifenol, terutama ECGC yang memiliki kemampuan tinggi dalam menetralkan radikal bebas serta mencegah stres oksidatif pada sel (Capasso et al., 2025). Sementara itu, *glutathione* menjaga keseimbangan redoks intraseluler dengan menetralkan radikal bebas, mereduksi hidroperoksida, serta melindungi lipid, protein, dan DNA dari kerusakan oksidatif (Zou et al., 2021). Meskipun mekanisme kerja keduanya, keduanya sama-sama mampu mengurangi dampak negatif stres oksidatif yang tidak dapat dicegah oleh pengencer tanpa tambahan antioksidan. Oleh karena itu kelompok perlakuan dengan antioksidan menunjukkan viabilitas lebih tinggi dibandingkan kontrol tanpa antioksidan. Hasil ini sejalan dengan penelitian Fitri et al. (2025) serta Pramesti & Ducha (2023) yang melaporkan bahwa penambahan antioksidan *glutathione* dan ekstrak teh hijau pada pengencer menghasilkan viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol tanpa penambahan antioksidan.

Pengujian Integritas Membran Spermatozoa

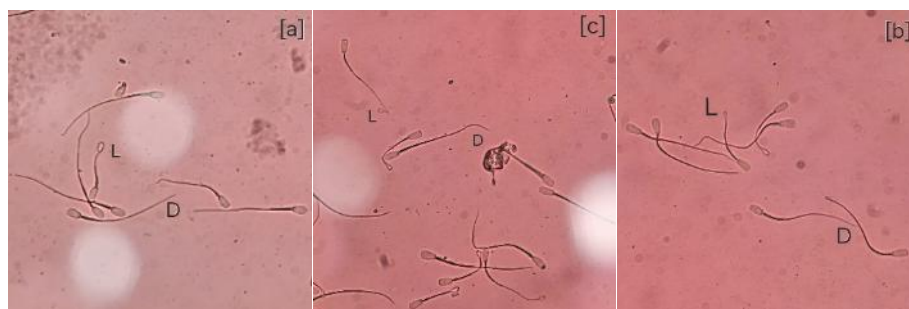
Pengujian integritas membran semen Sapi Bali dilakukan pada saat *before freezing* dan *post thawing* dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau. Hasil pengamatan integritas membran dapat dilihat di Tabel 4.

Tabel 4. Hasil persentase rata-rata $\pm$ standar deviasi viabilitas spermatozoa Sapi Bali dalam pengencer CEP dasar, CEP + 0.75 mM *glutathione*, dan CEP + 0.15% ekstrak teh hijau.

Rerata Integritas Membran (%)	Perlakuan		
	CEP	CEP + 0.75 mM <i>glutathione</i>	CEP + 0.15% ekstrak teh hijau
<i>Before freezing</i>	67.3 $\pm$ 1.7 ^a	74 $\pm$ 1.1 ^b	75 $\pm$ 2.5 ^b
<i>Post thawing</i>	52.8 $\pm$ 1.1 ^a	59.5 $\pm$ 2.7 ^b	62.1 $\pm$ 1.9 ^b

Keterangan: Notasi abjad yang berbeda pada tabel menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan ($P > 0.05$). Notasi a merupakan integritas membran terendah, dan begitupun seterusnya.

Berdasarkan Tabel 4 terlihat bahwa integritas membran spermatozoa menurun setelah proses pembekuan. Dari ketiga perlakuan, CEP + 0.15% ekstrak teh hijau memberikan hasil terbaik dengan nilai 75 $\pm$ 2.5% *before freezing* dan 62.1 $\pm$ 1.9% *post thawing*. Sebaliknya, nilai terendah diperoleh pada CEP tanpa tambahan antioksidan, yaitu 67.3 $\pm$ 1.7% *before freezing* dan 52.8 $\pm$ 1.1% *post thawing*.



Gambar 2. Integritas membran plasma spermatozoa Sapi Bali dengan perbesaran 400x

Deskripsi: [a] Pengencer CEP; [b] Pengencer CEP + 0.75 mM *glutathione*; [c] CEP + 0.15% ekstrak teh hijau; (D) spermatozoa ekor lurus; (L) spermatozoa ekor menggulung

Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 2, di mana spermatozoa yang hidup ditunjukkan dengan ekor yang menggulung (notasi L), sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan ekor lurus (notasi D). Analisis ANOVA menunjukkan bahwa penambahan antioksidan, baik 0.75 mM *glutathione* maupun ekstrak teh hijau, berpengaruh nyata dalam menjaga integritas membran dibandingkan dengan CEP dasar.

Persentase Integritas membran plasma spermatozoa yang lebih tinggi pada penambahan ekstrak teh hijau dan *glutathione* dibandingkan pengencer tanpa antioksidan menunjukkan bahwa keberadaan senyawa antioksidan berperan penting dalam melindungi struktur seluler selama proses kriopreservasi. Proses kriopreservasi menyebabkan pembentukan ROS yang kemudian memicu peroksidasi lipid serta dehidrasi sel yang mengganggu keseimbangan osmotik, sehingga merusak membran plasma (Suhartati et al., 2020).

Ekstrak teh hijau mengandung senyawa polifenol, terutama katekin seperti ECGC yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi (Purwanto et al., 2023). Senyawa ini bekerja dengan mendonasikan elektron kepada ROS, sehingga mampu menghambat proses peroksidasi lipid pada membran spermatozoa yang terjadi selama proses pembekuan dan pencairan semen (Susilowati et al., 2021). Selain itu, ECGC juga diketahui dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen seperti *catalase* (CAT), *superoxide dismutase 1* (SOD1), *superoxide dismutase 2* (SOD2), dan *glutathione peroxidase* (GPx), yang secara sinergis memperkuat perlindungan terhadap stres oksidatif (Zhang et al., 2020). Oleh karena itu, spermatozoa pada pengencer yang ditambahkan ekstrak teh hijau mampu mempertahankan integritas membran dengan lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil ini sejalan dengan penelitian Prastiya et al. (2023), yang melaporkan bahwa penambahan ekstrak teh hijau dalam pengencer menghasilkan nilai integritas membran lebih tinggi dibandingkan pengencer tanpa antioksidan.

Sementara itu, *glutathione* berfungsi sebagai antioksidan penting yang bekerja melalui sistem enzimatik endogen, terutama GPx dan *glutathione reductase* (GR) (Vašková et al., 2023). *Glutathione* membantu mereduksi H_2O_2 (Jena et al., 2023), dan menjaga keseimbangan redoks intraseluler (Georgiou-Siafis & Tsiftoglou, 2023). Mekanisme ini menghambat peroksidasi lipid dan melindungi integritas struktural membran spermatozoa (Wang et al., 2025). Oleh sebab itu, spermatozoa dalam pengencer dengan tambahan *glutathione* dapat mempertahankan fungsi membrannya setelah proses pembekuan dan *post thawing*. Hasil ini sejalan dengan penelitian Singh et al. (2024) yang melaporkan penambahan *glutathione* dalam pengencer dapat mempertahankan integritas membran spermatozoa kerbau.

Sebaliknya, pada pengencer tanpa tambahan antioksidan (kontrol), ROS yang terbentuk tidak dapat dinetralkan oleh antioksidan tambahan sehingga menyebabkan peroksidasi lipid yang tinggi. Peroksidasi lipid di membran sel dapat menyebabkan kerusakan membran dan berpotensi mengakibatkan kematian sel (Yang et al., 2020). Hal ini menjelaskan alasan perlakuan dengan ekstrak teh hijau menghasilkan integritas

membran tertinggi, diikuti *glutathione*, dan terendah pada perlakuan kontrol tanpa antioksidan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau dan *glutathione* secara signifikan lebih efektif dibandingkan kontrol, dengan ekstrak teh hijau cenderung memberikan nilai tertinggi pada motilitas, viabilitas, dan integritas membran pasca thawing. Penambahan ekstrak teh hijau berpotensi meningkatkan keberhasilan inseminasi buatan pada sapi Bali.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Program Studi Biologi Universitas Negeri Surabaya, serta semua pihak yang telah membantu dan mendukung terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alqawasmeh, O. A., Zhao, M., Chan, C. P., Leung, M. B., Chow, K. C., Agarwal, N., Mak, J. S., Wang, C. C., Pang, C. P., Li, T. C., Chu, W. K., & Chan, D. Y. (2021). Green tea extract as a cryoprotectant additive to preserve the motility and DNA integrity of human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 23(2), 150–156. https://doi.org/10.4103/aja.aja_58_20
- Androni, D. A., Dodds, S., Tomlinson, M., & Maalouf, W. E. (2021). Is pre-freeze sperm preparation more advantageous than post-freeze? *Reproduction and Fertility*, 2(1), 17–25. <https://doi.org/10.1530/RAF-20-0041>
- Argus, A., & Suhra, I. (2023). Studi manajemen perkawinan ternak dengan teknik inseminasi buatan (IB) pada sapi Madura di UPT Pembibitan dan Kesehatan Hewan. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*, 9(1), 118–127. <https://doi.org/10.33474/e-jbst.v9i1.551>
- Azzahra, T. A., Rachmadani, F. N., Saputra, R. A., Rusdi, R., & Lisanti, E. (2025). Respon fisiologis sapi Bali (*Bos javanicus*) yang dipelihara pada berbagai lingkungan termal di Indonesia: Sebuah meta-analisis. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis Dan Ilmu Pakan*, 6(4), 178–192. <https://doi.org/10.24198/jnttip.v6i4.55477>
- Badan Standardisasi Nasional. (2021). *SNI 4869-1:2021 SNI 4869-1:2021. Semen beku bagian 1: Sapi*. BSN.
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). (2024). *RSNI/3 4869-1:2024 Semen beku – Bagian 1: Sapi*.
- Bader, R., Ibrahim, J. N., Moussa, M., Mourad, A., Azoury, J., Azoury, J., & Alaaeddine, N. (2020). *In vitro* effect of autologous platelet-rich plasma on H₂O₂-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrology*, 8(1), 191–200. <https://doi.org/10.1111/andr.12648>
- Benko, F., Ďuračka, M., Bañas, Š., Lukáč, N., & Tvrdá, E. (2022). Biological relevance of free radicals in the process of physiological capacitation and cryocapacitation. *Oxygen*, 2(2), 164–176. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020014>
- Brillianti, F. F., Sianto, P., Sardjito, T., Suprayogi, T. W., Triana, I. N., & Rahardjo, D. (2021). Kualitas semen sapi pejantan berdasarkan umur, suhu, dan kelembaban di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga. *Ovozoa: Journal of Animal*

Reproduction, 10(3), 81. <https://doi.org/10.20473/ovz.v10i3.2021.81-89>

- Cao, B., Qin, J., Pan, B., Qazi, I. H., Ye, J., Fang, Y., & Zhou, G. (2022). Oxidative stress and oocyte cryopreservation: Recent advances in mitigation strategies involving antioxidants. *Cells*, 11(22), 3573. <https://doi.org/10.3390/cells11223573>
- Capasso, L., De Masi, L., Sirignano, C., Maresca, V., Basile, A., Nebbioso, A., Rigano, D., & Bontempo, P. (2025). Epigallocatechin gallate (EGCG): Pharmacological properties, biological activities and therapeutic potential. *Molecules*, 30(3), 654. <https://doi.org/10.3390/molecules30030654>
- Ducha, N. (2018). The test about blood serum capabilities in maintaining the quality of bull spermatozoa during storage in cep diluent at refrigerator temperature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130, 012043. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/130/1/012043>
- Ducha, N., Isnawati, I., Muhaimin, F. I., Prastyaningtias, S. D., Nafis, F. A. D., & Fitri, R. (2025). Sperm quality profile of Bali bull as local Indonesian cattle in liquid storage in different diluents with the addition of synthetic antioxidants. *BIO Web of Conferences*, 162, 00012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202516200012>
- Fazrien, W. A., Herwijanti, E., & Isnaini, N. (2020). Pengaruh variasi individu terhadap kualitas semen segar dan beku pejantan unggul Sapi Bali. *Sains Peternakan*, 18(1), 60. <https://doi.org/10.20961/sainspet.v18i1.37986>
- Fitri, R., Ducha, N., & Retnowulan, D. (2025). Effects of adding glutathione to CEP diluent on post-thawing sperm quality of Bali cattle. *LenteraBio*, 14(1), 63–71. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v14n1.p63-71>
- Fleming, S. D., & Thomson, L. K. (2025). The oxidative stress of human sperm cryopreservation. *Antioxidants*, 14(4), 402. <https://doi.org/10.3390/antiox14040402>
- Fuah, A. M., Yani, A., Priyanto, R., Purwanto, B. P., Riwukore, J. R., & Habaora, F. (2020). Analysis of the development of Bali cattle population in agriculture ecosystem of Timor Island using system dynamics. *Animal Production*, 22(2), 105–117. <https://doi.org/10.20884/1.jap.2020.22.2.45>
- Georgiou-Siafis, S. K., & Tsiftoglou, A. S. (2023). The key role of GSH in keeping the redox balance in mammalian cells: Mechanisms and significance of GSH in detoxification via formation of conjugates. *Antioxidants*, 12(11), 1953. <https://doi.org/10.3390/antiox12111953>
- Jena, A. B., Samal, R. R., Bhol, N. K., & Duttaroy, A. K. (2023). Cellular red-ox system in health and disease: The latest update. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114606. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114606>
- Kabir, M. F., & Ju, L.-K. (2023). On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochemistry*, 130, 734–746. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>
- Khalil, W. A., El-Hairry, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(sup1), S49–S56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Kim, E., Yu, I.-J., Lee, J., & Jeon, Y. (2024). Effects of MnTBAP on porcine semen cryopreservation and capacitation. *Antioxidants*, 13(6), 672. <https://doi.org/10.3390/antiox13060672>
- Kuswanto, A., Ningtyas, N. S. I., & Tirtasari, K. (2023) Analisa tingkat keberhasilan

- inseminasi buatan (IB) berdasarkan conception rate (Cr) pada ternak sapi betina potong produktif di Kecamatan Tarano Kabupaten Sumbawa NTB. *Mandalika Veterinary Journal*, 3(1), 16. <https://doi.org/10.33394/mvj.v3i1.7729>
- Mai, Z., Yang, D., Wang, D., Zhang, J., Zhou, Q., Han, B., & Sun, Z. (2024). A narrative review of mitochondrial dysfunction and male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 13(9), 2134–2145. <https://doi.org/10.21037/tau-24-262>
- Mujahidurrohman, M., Yuliani, E., & HY, L. (2023). Ability of melon (*Cucumis melo*. L) fruit juices based Tris diluent on the quality of frozen spermatozoa of Bali cattle after thawing. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(3), 450–463. <https://doi.org/10.29303/jbt.v23i3.5380>
- O'Flaherty, C., & Scarlata, E. (2022). Oxidative stress and reproductive function: The protection of mammalian spermatozoa against oxidative stress. *Reproduction*, 164(6), F67–F78. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0200>
- Partyka, A., & Niżański, W. (2021). Supplementation of avian semen extenders with antioxidants to improve semen quality—Is it an effective strategy? *Antioxidants*, 10(12), 1927. <https://doi.org/10.3390/antiox10121927>
- Pramesti, G. R. A., & Ducha, N. (2023). Effect of green tea extract on spermatozoa quality of Peranakan Ongole bull on frozen storage. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 15(2), 237–245. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v15i2.44573>
- Prastiya, R. A., Suprayogi, T. W., Debora, A. E., Wijayanti, A., Amalia, A., Sulistyowati, D., & Nugroho, A. P. (2023). Green tea extract addition into a Tris-based egg yolk extender improves Bali bull sperm quality. *Animal Bioscience*, 36(2), 209–217. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0184>
- Prihantoko, K. D., Yulastuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D. T., & Budiyo, A. (2020). The acrosome integrity examination of post-thawed spermatozoa of several Ongole grade bull in Indonesia using Giemsa staining method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 478(1), 012042. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/478/1/012042>
- Purwanto, D. A., Agustin, B. D., & Ekowati, J. (2023). A study of the stability of antioxidant activity of green tea extract powder with vitamin C. *Pharmacy Education*, 23(4), 159–163. <https://doi.org/10.46542/pe.2023.234.159163>
- Qamar, A. Y., Naveed, M. I., Raza, S., Fang, X., Roy, P. K., Bang, S., Tanga, B. M., Saadeldin, I. M., Lee, S., & Cho, J. (2023). Role of antioxidants in fertility preservation of sperm—A narrative review. *Animal Bioscience*, 36(3), 385–403. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0325>
- Singh, A. K., Wadhwa, B. S., Kumar, A., Honparkhe, M., Singh, N., & Singh, P. (2024). Effect of glutathione supplementation in extender on quality and fertility of cryopreserved buffalo semen. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 94(9), 792–796. <https://doi.org/10.56093/ijans.v94i9.148851>
- Sugiantini, N. L. M., Sumardani, N. L. G., & Suberata, I. W. (2023). Motilitas dan viabilitas spermatozoa babi dengan holding time dan lama thawing berbeda (*Sperm motility and viability of boars in different holding and thawing time*). *Jurnal Nukleus Peternakan*, 10(2), 9–16. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v10i2.11175>
- Suhartati, L., Udin, Z., & Rizqan, R. (2020). Laju penurunan suhu terhadap kualitas semen beku sapi Limousin menggunakan medium pengencer susu segar dan Tris kuning telur. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 22(3), 284–291. <https://doi.org/10.25077/jpi.22.3.284-291.2020>

- Susilowati, S., Sardjito, T., Mustofa, I., Widodo, O. S., & Kurnijasanti, R. (2021) Effect of green tea extract in extender of Simmental bull semen on pregnancy rate of recipients. *Animal Bioscience*, 34(2), 198–204. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0025>
- Tamargo, C., Garriga, F., Yeste, M., Pinart, E., Muiño, R., Carbajo, M. T., & Hidalgo, C. O. (2024). Predictive indicators of cryotolerance and fertility in bovine sperm: Evaluating fresh semen quality to improve AI outcomes with frozen-thawed sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(11). <https://doi.org/10.1111/rda.14742>
- Tethool, A. N., Ciptadi, G., Wahjuningsih, S., & Susilawati, T. (2022). Karakteristik dan jenis pengencer semen sapi Bali: Suatu review. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, 12(1). <https://doi.org/10.46549/jipvet.v12i1.214>
- Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L., & Perjési, P. (2023). Glutathione-related enzymes and proteins: A review. *Molecules*, 28(3), 1447. <https://doi.org/10.3390/molecules28031447>
- Wang, Y., Fu, X., & Li, H. (2025). Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Frontiers in Endocrinology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1520835>
- Wijayanti, A., Suprayogi, T. W., Prastiya, R. A., Hernawati, T., Sardjito, T., Saputro, A. L., Amaliya, A., & Sulistyowati, D. (2023).). Effect of addition of green tea extract (*Camellia sinensis*) in egg yolk Tris diluter on spermatozoa quality in Bali cattle (*Bos sondaicus*) after freezing. *Jurnal Medik Veteriner*, 6(1), 66–74. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol6.iss1.2023.66-74>
- Yang, H., Zhou, M., Li, H., Wei, T., Tang, C., Zhou, Y., & Long, X. (2020). Effects of low-level lipid peroxidation on the permeability of nitroaromatic molecules across a membrane. *ACS Omega*, 5(10), 4798–4806. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b0346>
- Zhang, Y., Lin, H., Liu, C., Huang, J., & Liu, Z. (2020). A review for physiological activities of EGCG and the role in improving fertility in humans/mammals. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110186. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110186>
- Zou, J., Wei, L., Li, D., Zhang, Y., Wang, G., Zhang, L., Cao, P., Yang, S., & Li, G. (2021). Effect of glutathione on sperm quality in Guanzhong dairy goat sperm during cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.771440>