

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sapi Limousin

Sapi Limousin merupakan keturunan sapi Eropa yang berkembang di Perancis. Karakteristik Sapi Limousin adalah pertambahan badan yang cepat perharinya sekitar 1,1 kg, tinggi mencapai 1,5 m, bulu tebal yang menutupi seluruh tubuh warnanya mulai dari kuning sampai merah keemasan, tanduknya berwarna cerah, bobot lahir tergolong kecil sampai medium (sapi betina dewasa mencapai 575 kg dan pejantan dewasa mencapai berat 1100 kg), fertilitasnya cukup tinggi, mudah melahirkan, mampu menyusui, dan mengasuh anak dengan baik serta pertumbuhannya cepat (Blakely dan Bade, 1994).

Sapi Limousin dapat berproduksi secara optimal pada daerah yang beriklim temperatur dengan suhu antara 4—15⁰C dengan mendapat hijauan serta konsentrat yang bernilai tinggi (Meyn, 1991). Menurut Thomas (1991), Sapi Limousin memiliki berat lahir rata-rata 39,95 kg dengan berat sapih pada umur 205 hari yaitu 198 kg.

B. Semen

Semen merupakan hasil sekresi organ reproduksi ternak jantan yang secara normal diejakulasikan melalui penis ke dalam saluran kelamin betina sewaktu

terjadi kopulasi, tetapi dengan kemajuan teknologi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan Inseminasi Buatan. Semen mengandung dua unsur utama, yaitu plasma semen dan *spermatozoa*. Plasma semen merupakan cairan yang sebagian besar disekresikan oleh kelenjar vesikularis dan jumlah kecil disekresikan oleh testis. Plasma semen mempunyai pH sekitar 7,0 dan tekanan osmotik sama dengan darah, yaitu ekuivalen dengan 0,9 % natrium chlorida (Toelihere, 1993).

Komponen yang terpenting dari semen tentu saja *spermatozoa*. Semen tanpa *spermatozoa* adalah *plasma* semen yang tidak memiliki sifat-sifat sangat penting dalam proses reproduksi hewan jantan, dengan fungsi utama membuahi *ovum*. Semen segar yang diejakulasikan oleh sapi jantan dikatakan normal, bila semen tersebut mengandung *spermatozoa* yang memperlihatkan daya gerak dan aktif, memiliki gerakan masa yang bergelombang. Banyaknya *spermatozoa* yang terdapat di dalam sejumlah semen tertentu, akan memengaruhi sifat penampakkannya. Semen yang encer dan jernih mengandung *spermatozoa* yang sedikit jumlahnya sedangkan semen yang keruh dan kental dalam keadaan yang normal memiliki konsentrasi *spermatozoa* tinggi (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Semen dari suatu spesies hewan mempunyai perbedaan dalam sifat-sifatnya dengan spesies lain. Perbedaan itu terletak pada volume, kekentalan, pH, konsentrasi, warna, dan baunya. Pada sapi dan domba memiliki volume semen sedikit karena kelenjar asesoris mengeluarkan cairan dalam jumlah yang rendah (Hardjopranjoto, 1995).

Semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi *spermatozoa*. Sapi pejantan menghasilkan semen yang normal berwarna kekuning-kuningan. Warna ini disebabkan oleh pigmen *riboflavin* yang dibawakan oleh satu *gene autosomal resesif* dan tidak mempunyai pengaruh terhadap *fertilitas*. Semen yang berwarna merah gelap sampai merah muda menandakan adanya darah segar dalam jumlah berbeda dan berasal dari saluran kelamin urethra atau penis. Warna kecoklat-coklatan menunjukkan adanya darah yang telah mengalami dekomposisi. Suatu warna coklat muda atau warna kehijau-hijauan menunjukkan kemungkinan kontaminasi dengan *faeces* (Toelihere, 1985).

Menurut Partodihardjo (1992), volume semen bervariasi antara 1—12 ml tiap ejakulasi untuk sapi yang masih muda dan untuk sapi yang telah dewasa dapat menghasilkan semen tiap ejakulat 10—15 ml. Teknologi Inseminasi Buatan dilakukan dengan tujuan memperoleh efisiensi dan efektifitas dalam penggunaan pejantan terpilih, menghindari terjadinya penyakit melalui sarana reproduksi dan untuk mengatasi bila terjadi kendala dalam proses perkawinan alami antara jantan dan betina. Menurut Susilawati *et al.*, (2003), semen yang berkualitas dari seekor pejantan unggul dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain berat badan, umur pejantan, sifat genetik, suhu dan musim, frekuensi ejakulasi dan makanan.

Toelihere (1985) menunjukkan bahwa penyimpanan dalam bentuk *straw* dapat menghemat tempat, ringan, dan praktis dibawa kemana-mana serta dapat dibuat berbagai warna dimana setiap warnanya untuk mengidentifikasi pejantan tertentu.

C. Semen Beku

Spermatozoa dalam semen beku dapat hidup bertahun-tahun. *Spermatozoa* yang dibekukan dan disimpan pada suhu -79°C di dalam CO_2 padat dan alkohol tahan hidup 3—4 tahun/lebih, sedangkan pada -196°C di dalam nitrogen cair tahan hidup dalam waktu sampai 10 tahun (Toelihere, 1993).

Semen beku adalah semen yang telah diencerkan kemudian dibekukan di bawah suhu 0°C atau titik beku air. Pembekuan semen merupakan usaha untuk menjamin daya tahan *spermatozoa* dalam waktu yang lama, melalui proses pengolahan, pengawetan, dan penyimpanan semen sehingga dapat digunakan pada suatu waktu sesuai kebutuhan (Graha, 2005). Semen beku sapi merupakan semen yang berasal dari pejantan sapi terpilih yang diencerkan sesuai prosedur proses produksi sehingga menjadi semen beku dan disimpan dalam rendaman nitrogen cair pada suhu -196°C pada kontainer (SNI 01.4869. 1-2005).

Semen beku yang telah dievaluasi dan mempunyai Post *Thawing* Motility (PTM) lebih dari 40% dapat disimpan untuk keperluan Inseminasi Buatan. Penyimpanan dapat dilakukan menggunakan kontainer nitrogen cair yang bersuhu -196°C .

Kapasitas kontainer yang digunakan disesuaikan dengan jumlah *straw* yang akan disimpan. Selain kontainer untuk penyimpanan semen beku, perlu disediakan kontainer untuk persediaan nitrogen cair. Persediaan nitrogen cair diperlukan untuk menambah persediaan nitrogen cair di dalam kontainer yang berisi *straw*. Kualitas semen beku akan tetap terjaga jika tetap terendam dalam N_2 cair.

Penyimpanan semen beku berbentuk *ampul* dalam rak ditempatkan pada beberapa *canister* dan disimpan di dalam bejana atau kontainer yang berisi nitrogen cair.

Bentuk-bentuk *straw* dan *pellet* ditempatkan dahulu didalam tabung-tabung plastik pendek (goblet) sebelum diletakkan didalam *canister* dan disimpan di dalam *canister* (Toelihere, 1993). Setiap pengiriman semen beku dalam kontainer harus diberi label, disegel dan disertai kartu petunjuk isi kontainer. Kartu petunjuk isi kontainer tersebut minimal harus berisi keterangan bangsa/*breed*, kode pejantan, jumlah, tanggal, dan hasil pemeriksaan mutu semen serta nama produsen (SNI 01. 4869. 1-2005).

Menurut Partodiharjo (1992), semen beku adalah semen yang telah diencerkan menurut prosedur dengan tujuan untuk menyediakan makanan bagi *spermatozoa* dan meningkatkan volume dengan menurunkan konsentrasi semen sehingga didapat 25 juta sel *spermatozoa* dalam satu *straw* yang sebelumnya telah dilakukan pemeriksaan saat semen segar, kemudian dibekukan jauh dari titik 0°C tergantung pada zat yang dipakai untuk membekukan semen tersebut. Pembekuan bisa menggunakan es kering, cairan udara, O_2 cair, dan N_2 cair. N_2 cair yang populer digunakan sebab dapat membekukan pada suhu yang paling rendah dan dapat menyimpan semen dalam waktu yang lama. Kombinasi es kering dan kristal CO_2 dapat mencapai titik -70°C , cairan N_2 suhunya -196°C , sedangkan CO_2 cair dan udara cair suhunya -190°C .

Toelihere (1993), keuntungan menggunakan semen beku diantaranya:

1. semen pejantan-pejantan unggul, baik yang masih sehat maupun yang terluka, cacat, pincang, dapat dipakai secara efisien sepanjang tahun;
2. mengatasi hambatan waktu dan jarak;
3. memungkinkan perkawinan selektif dengan pejantan-pejantan unggul untuk daerah yang luas;

4. biaya pengangkutan semen dari pusat Inseminasi Buatan ke pelaksanaan inseminasi di daerah atau di lapangan dan di pelosok-pelosok sangat dikurangi karena penyediaan semen dan nitrogen cair hanya dilakukan sekali sebulan, tidak dua kali seminggu seperti dengan semen cair. Semen beku dapat dikirimkan dengan mobil, kereta api, atau barang kiriman pos melalui kapal udara atau kapal laut;
5. pembekuan semen memungkinkan pengawetan semen pejantan-pejantan muda sebelum mencapai umur yang lebih tua dimana semennya menjadi relatif infertil.

Hafez (1993), model pengemasan semen beku yang biasa digunakan yaitu:

1. *straw* yang dibuat dari *polivinil klorida* terdapat dua ukuran yang *ministray* berisi 0,25 ml dan *midistray* 0,5 semen;
2. ampul gelas berisi 0,5—1 ml semen;
3. pellet berisi 0,1—0,2 ml semen.

Umur dan daya guna semen yang dibekukan akan bertambah lama karena pembekuan adalah menghentikan sementara kegiatan hidup dari sel (metabolisme sel) tanpa mematikan fungsi sel dimana proses hidup dapat terus berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Pada prinsipnya menggunakan faktor penurunan temperatur untuk mempertahankan daya hidup dan kemampuan fertilisasi *spermatozoa* (Partodiharjo, 1992).

D. Pembekuan Semen

Peraturan Direktur Jenderal Peternakan Nomor :1220/HK.060/F/12/2007 Tentang Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku bahwa proses pembekuan semen dilakukan melalui 2 (dua) tahap yaitu :

1. Pra pembekuan (*pre freezing*)

Proses *pre freezing* dilakukan dalam *storage* kontainer, *straw* disusun dirak dan dilakukan 2—4 cm diatas permukaan N₂ cair selama 5—9 menit.

2. Pembekuan (*freezing*)

Pembekuan dilakukan setelah *pre freezing*, *straw* diletakkan dalam goblet dan *canister*, direndam dalam N₂ cair suhu -196⁰C.

Keuntungan dengan dilakukannya pembekuan semen yaitu:

1. efisiensi penggunaan semen pajantan-pejantan unggul baik yang masih sehat maupun cacat sepanjang tahun;
2. mengatasi hambatan jarak dan waktu;
3. memungkinkan perkawinan pejantan-pejantan unggul untuk daerah luas;
4. biaya transportasi relatif murah.

Tabel 1. Pengaruh ketinggian *straw* di atas permukaan N₂ cair terhadap kualitas semen beku.

| Ketinggian <i>straw</i> | Motilitas (%) | Hidup (%) | Abnormal (%) |
|-------------------------|---------------|-----------|--------------|
| 4 cm | 23 | 36 | 4 |
| 6 cm | 29 | 46 | 10 |
| 8 cm | 37 | 40 | 9 |
| 10 cm | 43 | 39 | 12 |

Sumber : Kaiin *et al.*, 2004.

Permasalahan yang sering terjadi saat proses pembekuan semen yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air dengan terbentuknya kristal-kristal es. Kristal-kristal es intraseluler dapat merusak *spermatozoa* secara mekanik. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel sperma waktu pencairan kembali (*thawing*), permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. *Spermatozoa* banyak mengalami kerusakan pada suhu antara $-1,5^{\circ}\text{C}$ dan $-3,0^{\circ}\text{C}$ rata-rata pada suhu $-1,7^{\circ}\text{C}$. Kerusakan 20% dari seluruh sperma pada waktu pembekuan masih dianggap memuaskan (Toelihere, 1993).

Proses pembuatan semen beku terdiri dari: (1) proses pengenceran, yaitu perhitungan volume pengencer dan proses pengenceran dengan pengencer organik (*skim milk*) ataupun anorganik (tris); (2) pemeriksaan *before freezing*, setelah proses pengenceran selesai maka dilakukan pemeriksaan secara mikroskopik terhadap motilitas sel *spermatozoa* yang bergerak aktif maju ke depan (progresif) dengan nilai minimal 70%; (3) proses *filling* dan *sealing*, dilakukan di dalam *cool top* yang bersuhu $3 - 5^{\circ}\text{C}$; (4) *pre freezing*, *straw* yang telah dikemas disusun di atas rak, kemudian diletakkan di atas nitrogen cair dalam kontainer, processing sampai suhunya mencapai -140°C , yang membutuhkan waktu sebanyak 9 menit; (5) *freezing* (pembekuan), *straw* dimasukkan ke dalam gablet dan setelah itu direndam dalam nitrogen cair -196°C dalam kontainer.

Proses pembekuan semen meliputi:

1. *Cooling* (pendinginan) merupakan proses pendinginan semen setelah proses pengenceran, dimasukkan dalam gelas ukur tertutup dan ditempatkan pada

beaker glass berisi air. *Cooling* sampai 5°C dapat dilakukan dengan memasukkan tabung-tabung yang berisi semen yang telah diencerkan dalam bak yang berisi air (Toelihere, 1985).

2. *Pre freezing* (pembekuan awal) yaitu *straw* yang berisi semen diatur pada rak *straw* dan ditempatkan dalam uap N_2 cair sekitar 4,5 cm diatas permukaan nitrogen cair. Pembekuan ini berlangsung sekitar 10 menit, kemudian dimasukkan langsung ke dalam nitrogen cair (Toelihere, 1985).

3. *Freezing* (pembekuan)

Freezing merupakan proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel dan proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan sedangkan semen beku adalah semen yang telah diencerkan menurut prosedur lalu dibekukan di bawah suhu 0°C atau titik beku air (Partodiharjo, 1992).

Pembekuan atau pencairan semen beku dapat menyebabkan kerusakan *spermatozoa* dan menghilangkan fertilitas *spermatozoa*. Untuk membuahi sel telur, *spermatozoa* harus mempertahankan kemampuannya untuk memasuki oosit dan flagellum dengan mendorong permukaan membran dan menghindari pencakupan oleh fagosit pada saluran reproduksi atau pengikatan ireversibel pada sel epitel (Blakely dan Bade, 1994).

Menurut Partodiharjo (1992), *Freezing* merupakan proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel dan proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Sedangkan semen beku adalah semen yang telah diencerkan menurut prosedur lalu dibekukan di bawah suhu 0°C .

Menurut Toelihere (1993), pembekuan dapat menggunakan CO₂ padat, udara basah, O₂ cair dan nitrogen cair. Pembekuan dengan N₂ cair lebih sering digunakan karena suhunya yang sangat rendah dapat menyimpan semen dalam jangka waktu yang lama. Pada proses ini *straw* direndam dengan suhu -196⁰C. Volume N₂ cair harus dikontrol secara periodik, karena jika kehabisan akan menaikkan suhu sehingga akan mematikan *spermatozoa*. Untuk menjamin kelangsungan hidup *spermatozoa* yang terkandung di dalam *straw* maka N₂ cair di dalam kontainer tidak boleh kurang dari ukuran minimal yang ditentukan yaitu setinggi 13,3 cm. Seandainya 13,3 cm, maka penambahan N₂ cair harus dilakukan segera dalam waktu 12 jam.

Salah satu kendala penyimpanan semen beku dengan nitrogen cair adalah sifat nitrogen cair yang mudah menguap. Faktor yang mempercepat terjadinya penguapan nitrogen cair diantaranya cara menyimpan kontainer, intensitas terbukanya tutup kontainer, jumlah akseptor, dan jenis kontainer. Kontainer merupakan bejana vakum yang terdiri dari bahan baja atau aluminium dengan dinding berisi ruang vakum dan isolasi yang ketat. Kontainer yang kurang baik mutunya sering bocor karena dinding vakumnya tidak normal lagi atau tutupnya terlalu longgar dan menyebabkan penguapan nitrogen cair terlalu banyak dan terlalu cepat (Tolihere, 1993).

Kontainer merupakan bejana vakum yang umumnya terdiri dari bahan baja atau aluminium dengan dinding berisi ruang vakum dan isolasi yang ketat dengan ukuran yang berbagai ukuran sesuai dengan kebutuhan. Satu kontainer di Pusat IB dengan ukuran besar dapat memuat 45.000—100.000 semen beku ampul atau

straw. Kontainer tersebut diisi dengan larutan nitrogen cair (N₂) dengan temperatur -196⁰C. Semen beku yang disimpan dalam kontainer, maka dapat disimpan dalam waktu yang lama bahkan hingga bertahun-tahun sebelum didistribusikan ke peternak atau ke daerah-daerah.

E. Motilitas *Spermatozoa*

Motilitas merupakan salah satu kriteria penentu kualitas semen yang dilihat dari banyaknya *spermatozoa* yang motil progresif dibandingkan dengan seluruh *spermatozoa* yang ada dalam satu pandang mikroskop. Menurut Evans dan Maxwell (1997), terdapat tiga tipe pergerakan *spermatozoa* yaitu pergerakan progresif (maju ke depan), pergerakan rotasi (gerakan berputar) dan osilator atau konvulsif tanpa pergerakan ke depan atau perpindahan posisi. Skala presentase pergerakan dari 0 sampai 100 atau 0 sampai 10 merupakan penilaian standar untuk mencapai tujuan bersama.

Evaluasi motilitas *spermatozoa post thawing* adalah salah satu parameter yang banyak digunakan untuk menentukan kualitas semen sapi yang akan digunakan untuk Inseminasi Buatan. Syarat minimal motilitas individu semen *post thawing* agar semen dapat dipergunakan dalam Inseminasi Buatan adalah 40% (Garner dan Hafez, 2000). Susilawati *et al.*, (2003) menunjukkan proses fertilisasi membutuhkan *spermatozoa* motil sekitar sepuluh juta *spermatozoa*, maka syarat *spermatozoa* sebagai standar inseminasi adalah $2,5 \times 10^7$ *spermatozoa* per *straw* dengan motilitas 40%.

Motilitas mempunyai nilai 0—100% meliputi gerakan massa dan gerakan individu (Toelihere, 1993). Banyak hal-hal yang dapat menyebabkan rendahnya kualitas semen beku terutama terhadap motilitas diantaranya suhu dan kelembaban, *thawing*, jarak *straw*, cara penyimpanan semen beku, dan penambahan nitrogen cair. Suhu berperan sangat besar dalam menentukan motilitas sebab kadar metabolisme dan motilitas *spermatozoa* berbeda (Toelihere, 1993). Suhu panas dan kelembaban yang terlalu mudah atau dingin secara terus menerus lebih berpengaruh buruk terhadap fertilitas daripada suhu dan kelembaban yang berganti-ganti panas dan dingin sehingga berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas semen beku terutama motilitas yang akhirnya menurunkan angka konsepsi (Toelihere, 1993).

Energi yang digunakan untuk motilitas *spermatozoa* berasal dari perombakan ATP di dalam selubung mitokondria melalui reaksi-reaksi penguraiannya menjadi ADP (*adenosin diphosphat*) dan AMP (*adenosin monophosphat*). Energi yang dihasilkan ini akan dipakai sebagai pergerakan (energi mekanik) atau sebagai biosintesis (energi kimiawi). Dalam semen terdapat empat bahan organik yang dapat dipakai secara langsung maupun tidak langsung oleh *spermatozoa* sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitas *spermatozoa*. Bahan-bahan tersebut adalah fruktosa, serbitol, GPC (*glycerylphosphorylcholine*), dan plasmalogen (Toelihere, 1993).

Penilaian gerakan individual *spermatozoa* menggunakan mikroskop dan melihat pola pergerakan progresif atau gerakan aktif maju ke depan merupakan gerakan terbaik. Gerakan melingkar atau gerakan mundur merupakan tanda *cold shock*

atau media yang kurang isotonik terhadap semen. Gerakan berayun dan berputar-putar di tempat biasanya terlihat pada semen yang sudah tua dan apabila kebanyakan *spermatozoa* berhenti bergerak dan dianggap mati. Motilitas *spermatozoa* dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme *spermatozoa* yang ditunjang oleh lingkungan yaitu suhu dan komponen-komponen yang terdapat di dalam medium (Toelihere, 1993).

Pergerakan gerak individu ini sangat dipengaruhi oleh peneliti terutama keterampilan dan pengalaman dari pemeriksaan secara mikroskopis. Oleh karena itu penelitian dari seseorang dengan orang lain berbeda (Susilawati *et al.*, 2003).

F. *Spermatozoa* Hidup

Spermatozoa normal memiliki kepala, leher, badan, dan ekor. Bagian depan kepala tampak sekitar 2/3 bagian tertutup oleh akrosom. Tempat sambungan dasar akrosom dan kepala disebut cincin nucleus. Antar kepala dan badan terdapat sambungan pendek yaitu leher yang berisi sentriol proksimal, kadang dinyatakan sebagai pusat kinetik aktifitas *spermatozoa*. Bagian badan dimulai dari leher dan berlanjut ke cincin sentriol. Bagian badan dan ekor mampu bergerak bebas meskipun tanpa kepala. Ekor membantu mendorong *spermatozoa* untuk bergerak maju (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Persentase *spermatozoa* hidup tinggi serta gerak progresif dan kuat merupakan tanda semen berkualitas baik. Persentase *spermatozoa* hidup dan mati dapat ditentukan melalui cara pewarnaan. Perbedaan penyerapan zat warna antara sel-sel *spermatozoa* mati dan hidup dapat digunakan menghitung secara objektif

jumlah *spermatozoa* hidup atau mati, sewaktu semen dicampur dengan zat warna, maka *spermatozoa* hidup (viabil) tidak akan menyerap warna karena membrannya masih bagus. *Spermatozoa* yang motil dan hidup tidak berwarna (Suyadi dan Susilawati, 1992). Menurut Susilawati *et al.*, (2003) menunjukkan bahwa kadang-kadang *spermatozoa* masih hidup akan mengambil warna sebagian dari ekor sampai setengah badan.

Pengambilan zat warna oleh *spermatozoa* dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti sekresi kelenjar asesoris, pH, suhu, kesalahan teknik pada waktu pembuatan preparat, dan umur semen sesudah pengambilan semen. Persentase hidup dan mati sangat dipengaruhi oleh suhu, sinar matahari secara langsung dan goncangan yang berlebihan (Toelihere, 1993). Metode pewarnaan eosin 2% adalah metode yang dilakukan dalam pemeriksaan persentase *spermatozoa* hidup.

Keterbatasan daya hidup *spermatozoa* selain disebabkan oleh *cold shock* juga disebabkan oleh terjadinya *deficit energi* dan kerusakan membran sel sebagai hasil reaksi peroksida lemak (Situmorang *et al.*, 2000). Menurut Toelihere (1993), untuk mempertahankan kehidupan *spermatozoa* maka semen beku dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi nitrogen cair pada suhu -196°C dan terus dipertahankan pada suhu tersebut sampai waktu dipakai.

Pengamatan hidup mati *spermatozoa* atau viabilitas dapat dilakukan dengan metode pewarnaan diferensial menggunakan zat warna eosin saja atau dengan kombinasi eosin-nigrosin. Eosin adalah zat warna khusus untuk *spermatozoa*, sedangkan nigrosin hanya dipakai untuk pewarnaan dasar untuk memudahkan melihat perbedaan antara *spermatozoa* yang berwarna dan tidak berwarna. Prinsip

metode pewarnaan eosin-nigrosin adalah terjadinya penyerapan zat warna eosin pada *spermatozoa* yang mati pada saat pewarnaan tersebut dilakukan. Hal ini terjadi karena membran pada *spermatozoa* yang mati tidak permeabel terhadap zat warna atau memiliki aktivitas yang rendah sehingga menyebabkan *spermatozoa* yang mati berwarna merah (Toelihere, 1993).

Penentuan persentase hidup *spermatozoa* dilakukan setelah semen beku dibuat preparat apus. Menurut Salisbury dan Van Denmark (1985), persentase hidup *spermatozoa* dapat dihitung dengan melihat reaksi *spermatozoa* terhadap zat warna tertentu. Standar yang digunakan untuk *spermatozoa* mati adalah kepala atau seluruh tubuh *spermatozoa* menyerap warna. *Spermatozoa* yang hidup tidak berwarna sedangkan *spermatozoa* yang mati akan menyerap warna. Zat warna yang digunakan adalah eosin atau eosin-negrosin. Pada waktu semen bercampur dengan zat warna, sel-sel *spermatozoa* yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap warna (berwarna putih) sedangkan sel-sel yang mati akan mengisap warna (merah) karena permeabilitas dinding sel meningkat saat mati.