

KONSERVASI PLASMANUTFAH UNGGAS MELALUI KRIOPRESERVASI *PRIMORDIAL GERM CELLS* (PGCs)

A.R. SETIOKO

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

(Makalah diterima 9 Maret 2008 – Revisi 17 Juni 2008)

ABSTRAK

Indonesia memiliki potensi sumberdaya plasmanutfah unggas lokal yang berlimpah, sehingga materi genetik tersebut perlu dikonservasi untuk digunakan dalam pengembangan unggas di waktu yang akan datang. Konservasi plasmanutfah unggas hidup, baik secara *in-situ* maupun *ex-situ* akan sangat mahal dan beresiko kematian yang tinggi akibat penyakit seperti flu burung. Kriopreservasi *Primordial Germ Cells* (PGCs) yang merupakan progenitor dari sel telur dan spermatozoa, adalah cara alternatif untuk preservasi materi genetik baik pada unggas jantan maupun betina. PGCs secara spesifik dapat dipanen dari blastoderma atau darah embrio dan dapat disimpan didalam nitrogen cair seperti halnya pada sperma, ovum atau embrio pada hewan ruminansia. Teknik untuk menghasilkan ayam *germline chimera* telah dapat dilakukan dengan cara mentransfer PGCs ke dalam sirkulasi darah embrio yang PGCs aslinya telah dikeluarkan atau dinonaktifkan. Perkawinan antara ayam *chimera* jantan dan betina akan menghasilkan keturunan yang berasal seluruhnya dari donor PGCs. Konservasi materi genetik plasmanutfah unggas Indonesia yang dilakukan melalui penyimpanan PGCs dapat digunakan untuk pengembangan unggas di masa mendatang.

Kata kunci: Plasmanutfah, konservasi, unggas, PGCs, *chimera*

ABSTRACT

CONSERVATION OF POULTRY GERMLASM THROUGH CRYOPRESERVATION OF PRIMORDIAL GERM CELLS (PGCs)

Indonesia has abundantly available genetic potential of local poultry that needs to be conserved for future use of poultry development. Live conservation of poultry, both *in-situ* and *ex-situ*, would be very expensive and has a risk of mortality due to diseases such as avian influenza. Cryopreservation of *Primordial Germ Cells* (PGCs), which are progenitor of eggs and spermatozoa, provides an alternative way to preserve both male and female genetic materials in poultry. PGCs in poultry can be specifically harvested from blastoderm or blood embryo, and preserved in a liquid nitrogen similar to sperm, ovum and embryo in large ruminant. Technique for producing germline chimeric chicken has been established by transferring PGCs into the circulated blood embryo where the original PGCs have been removed or inactivated. Mating of germline *chimeras* yields offsprings that are derived entirely from the donor stock. Conservation of genetic materials of Indonesian indigenous poultry through preservation of PGCs could be used for future poultry improvement.

Key words: Genetic resources, conservation, poultry, PGCs, *chimera*

PENDAHULUAN

Beberapa jenis ternak yang ada di bumi saat ini dalam keadaan hampir punah atau mendekati kepunahan, bahkan sebagian sudah punah. Laporan dari FAO (2000) menyebutkan bahwa dari 6379 populasi jenis ternak, 9% pada kondisi kritis (*critical condition*) dan 39% dalam keadaan hampir punah (*endangered*). Keberadaan keanekaragaman hayati (*biodiversity*) sangat terkait dengan konservasi sumberdaya genetik ternak, namun demikian strategi konservasi yang ada masih belum dilaksanakan dengan baik.

Ada beberapa pilihan dalam rangka konservasi sumberdaya genetik ternak. Secara umum, konservasi

in-situ atau dikenal dengan istilah *conservation by utilization* lebih disukai sebagai mekanisme untuk konservasi berbagai bangsa ternak. Selain konservasi *in-situ*, metode atau teknik untuk memelihara bangsa ternak di luar habitatnya (*ex-situ*, hidup), dan melalui kriopreservasi plasma nutfah (*ex-situ*) telah dibangun khususnya untuk populasi yang langka dan juga untuk *commercial breeds* yang secara luas dapat dimanfaatkan (HIEMSTRA *et al.*, 2005).

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang berlimpah, diantaranya adalah jenis-jenis ayam, baik ayam lokal asli Indonesia maupun ayam lokal introduksi yang telah lama beradaptasi di Indonesia. Beberapa rumpun ayam Indonesia merupakan plasmanutfah atau sumberdaya genetik yang masih

perlu digali potensinya baik sebagai penghasil daging, telur ataupun klangenan (*fancy*). NATAAMIJAYA (2000) melaporkan bahwa di Indonesia terdapat 31 rumpun ayam lokal. Saat ini, kemungkinan sudah sulit untuk mendapatkan koleksi sebanyak itu, karena beberapa rumpun ayam tersebut mungkin sudah punah atau hampir punah. Mengingat hal tersebut, maka kegiatan konservasi plasma nutfah ayam lokal perlu segera dilakukan di Indonesia. SARTIKA dan ISKANDAR (2007) mengidentifikasi sedikitnya ada empat jenis ayam lokal langka yang perlu dieksplorasi yakni ayam Tukong, Jantur, Ciparage dan Ayunai. Selain itu, ada delapan jenis ayam lokal langka yang belum banyak informasinya dan masih perlu digali lebih lanjut yaitu ayam Sedayu, Burgo, Lamba, Nusa Penida, Maleo, Banten, Jepun dan Delona. Selain itu juga dilaporkan jenis-jenis ayam yang mempunyai suara kokok yang merdu, jenis ayam lokal komersial penghasil daging dan telur seperti ayam kampung, ayam Sentul, ayam Arab, ayam Kalosi dan ayam Wareng. Jenis-jenis ayam tersebut perlu dikonservasi agar tidak punah dan dapat dimanfaatkan di kemudian hari.

Strategi konservasi *ex-situ* saat ini sedang tumbuh dengan cepat untuk berbagai macam tujuan. Di beberapa negara, konservasi *ex-situ* merupakan bagian dari komponen integral strategi konservasi. Beberapa strategi difokuskan pada unggas yang sudah mulai langka, tetapi secara umum ada semacam konsensus bahwa koleksi *ex-situ* harus dilakukan untuk semua bangsa ternak, dengan tujuan untuk menangkap sebanyak mungkin keragaman genetik dalam program konservasi. Bila hal ini dilakukan sudah barang tentu akan menggunakan dana yang besar untuk memelihara unggas hidup. Selain itu, unggas harus dijaga agar tetap sehat dan tidak mati. Hal ini tidak ada jaminan, apalagi dengan merebaknya penyakit flu burung, sehingga berbagai upaya dilakukan. Salah satu upaya yang ada yaitu dengan kriopreservasi, yakni penyimpanan plasma nutfah dalam bentuk sel beku baik dalam bentuk sperma, ovum ataupun embrio. Pada unggas, penyimpanan sperma sudah banyak dilakukan walaupun hasilnya masih sangat bervariasi (HAMMERTEDT dan GRAHAM, 1992), sedangkan penyimpanan ovum dan embrio unggas belum dapat dilakukan karena struktur dan ukuran yang besar pada kuning telur (NAITO, 1997; 1998). Perkembangan terakhir tentang teknik manipulasi embrio, memungkinkan untuk mendapatkan keturunan yang sehat dari sel *germline* yang dibekukan dan *dithawing* melalui ayam *chimera* (NAITO, 2003).

Konservasi plasmanutfah unggas lokal melalui kriopreservasi PGCs selain dapat digunakan untuk konservasi materi genetik untuk pengembangan unggas di masa mendatang juga dapat digunakan untuk preservasi unggas yang kondisi kritis atau hampir punah (TAGAMI *et al.*, 2007). Tujuan dari makalah ini adalah untuk mengulas lebih dalam tentang konservasi

plasmanutfah pada unggas khususnya melalui kriopreservasi PGCs, perkembangan dan distribusi PGCs pada embrio ayam, teknik pemurnian dan konservasi PGCs dan bagaimana mendapatkan unggas *chimera* agar diperoleh kembali unggas asli yang dikonservasi.

PRINSIP KRIOPRESERVASI

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan materi biologi tanpa mengalami kerusakan dalam waktu yang sangat lama, hingga ribuan tahun (MAZUR, 1985). Perkembangan terakhir yang dikenal dengan metode *slow cooling*, dimana materi biologi dibekukan dengan tingkatan pembekuan yang cukup cepat agar tidak terjadi kerusakan pembekuan lambat (*slow cooling damage*), tetapi juga cukup lambat agar tidak terjadi dehidrasi dari sel dan pembentukan kristal es intraselular (*intracellular ice formation*) (MAZUR *et al.*, 1972).

Kriopreservasi semen

Semen dari hampir semua spesies ternak dapat dibekukan secara baik, termasuk berbagai macam unggas, dan mamalia. Berbagai peralatan media pembekuan mulai dari alat pengumpulan semen, pengepakan, pembekuan dan alat inseminasi telah berkembang dengan pesat dan tersedia secara komersial. Pada industri inseminasi buatan pada sapi, kualitas semen setelah *thawing* sama dengan semen segar dengan catatan dosis per inseminasi harus lebih tinggi. Namun pada unggas, pembekuan semen ayam, kalkun dan itik belum memberikan hasil yang baik. Persentase spema hidup setelah *thawing* hanya mampu mencapai 60%. Hasil secara lengkap tentang inseminasi sperma unggas setelah *thawing* dilaporkan oleh BLESBOIS dan LABBE (2003). Namun demikian, fertilitas spermatozoa pada unggas setelah *thawing* yang dilaporkan oleh HAMMERTEDT dan GHRAHAM (1992) sangat bervariasi mulai dari 9% sampai 91%. Dilaporkan oleh WISHART (1985) bahwa jumlah spermatozoa yang diinseminasikan untuk memperoleh maksimum fertilitas pada ayam jauh lebih besar pada sperma yang dibekukan dibanding dengan sperma segar. Media pembekuan sperma sangat bervariasi tidak hanya tergantung pada bangsa ternak, tetapi juga jenis ternak. Pada umumnya, media yang sering digunakan adalah salin atau sakarida, dengan *cryoprotective agent* (CPA) yang cocok pada konsentrasi antara 0,2 – 1,5 M. Selain itu, penambahan makromolekular protektif seperti susu dan kuning telur atau komponen lemak tanaman sering digunakan pada semen mamalia (BOUSEAU *et al.*, 1998). Namun penambahan zat-zat tersebut umumnya tidak digunakan

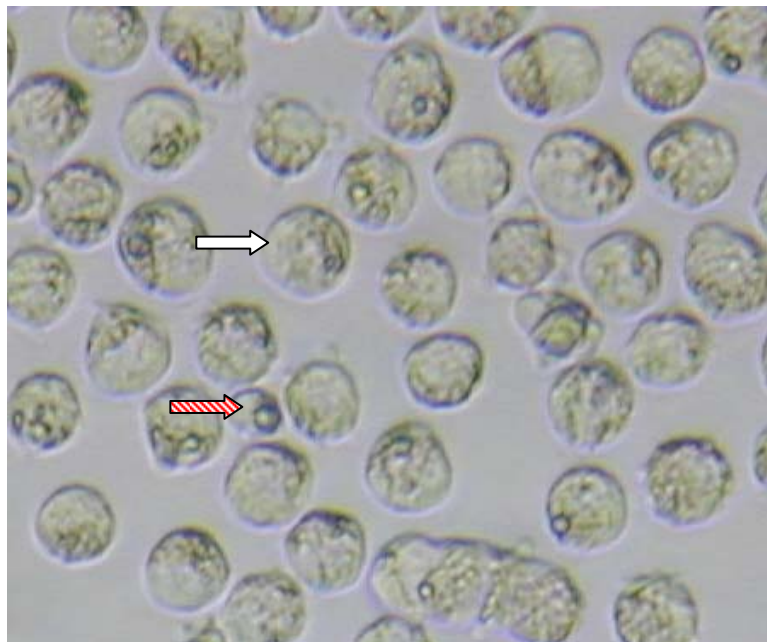
untuk media pembekuan semen unggas, walaupun beberapa studi pada semen ikan, kuning telur ditemukan mampu memproteksi terhadap kerusakan sel (CABRITA *et al.*, 1998). Gliserol juga cocok untuk digunakan sebagai CPA pada sperma mamalia, unggas dan ikan. Namun pada unggas, gliserol dapat menyebabkan kontraseptif, oleh karena itu semen harus dicuci terlebih dahulu setelah *thawing* agar bebas dari gliserol (HAMMERSTEDT dan GRAHAM, 1992). Penggunaan *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *ethylene glycol* (EG), *N,N-dimethylacetamide* (DMA) dan *N,N-dimethylformamide* (DMF) sering dipakai sebagai CPA pada sperma unggas. Semen biasanya dibekukan dengan metode *slow cooling*, dengan optimum laju pembekuan umumnya antara 10 dan 100°C per menit. Beberapa peneliti membekukan dengan laju pembekuan yang berbeda dengan menggunakan tipe dan konsentrasi CPA yang berbeda. Contoh yang ekstrim bahwa semen ayam dapat dibekukan secara efektif pada laju pembekuan sekitar 600°C per menit dengan menggunakan DMA sebagai CPA (WOELDERS dan CHAVEIRO, 2004).

Kriopreservasi sel telur dan embrio

Pada 10 tahun terakhir, perkembangan yang sangat pesat terjadi pada kriopreservasi sel telur atau *oocyte* pada beberapa spesies ternak. Sel telur yang baik telah diperoleh setelah dibekukan dan *thawing* (WOELDERS *et al.*, 2003). Pembekuan sel telur pada unggas masih belum berhasil mengingat ukuran yang besar dan kompleks juga kandungan lemak yang tinggi pada unggas (BLESBOIS dan LABBÉ, 2003). Demikian juga dengan kriopreservasi pada embrio unggas masih belum dapat dilakukan karena keterbatasan yang sama pada sel telur (HAGEDORN *et al.*, 2004).

PERKEMBANGAN DAN DISTRIBUSI PRIMORDIAL GERM CELLS (PGCs) PADA EMBRIO AYAM

PGCs adalah sel asli (*original cells*) dari spermatogonia pada testes atau *oogonia* di *ovary*. PGCs dapat dibedakan dengan sel lain karena memiliki ukuran yang lebih besar dan bentuk sperikal (Gambar 1).



Gambar 1. PGCs dapat dibedakan dengan sel darah merah karena ukurannya yang lebih besar dan bentuk yang sperikal

- ⇨ PGCs memiliki sel yang besar dan sperikal
- ⇨ Sel darah merah

Sumber: SETIOKO *et al.* (2007)

PGCs secara spesifik dapat dipanen dari embrio ayam (TAGAMI *et al.*, 2007) dan teknik untuk menghasilkan *germline chimera* ayam dengan mentransfer PGCs telah dapat dilakukan (YASUDA *et al.*, 1992; TAJIMA *et al.*, 1993). Oleh sebab itu, kriopreservasi PGCs pada unggas merupakan cara alternatif konservasi materi genetik pada unggas jantan maupun betina. PGCs yang telah disimpan dapat menghasilkan keturunan ayam yang sehat melalui ayam *germline chimera*. PGCs pada ayam memiliki perjalanan yang unik pada perkembangan awal embrio. PGCs berasal dari *epiblast* dan tampak di *area germinal crescent* dari *primitive streak*. Kemudian sel tersebut berada dalam sirkulasi darah ke seluruh tubuh embrio dan pada akhirnya membentuk koloni di dalam *germinal ridges* (KUWANA, 1993). Setelah itu, sel tersebut membelah menjadi sel telur pada betina atau spermatozoa pada jantan (NAITO *et al.*, 1994a).

Untuk mengetahui perkembangan dan distribusi PGCs pada embrio ayam, diperlukan teknik pengecatan PGCs yang tepat agar keberadaan dan lokasi PGCs dalam embrio ayam dapat diidentifikasi. Pada awalnya PGCs diidentifikasi menggunakan kriteria morfologi, seperti ukuran sel yang besar, nukleus yang sferikal dan besar serta adanya lemak refraktif pada sitoplasmanya (ZHAO dan KUWANA, 2003). Bersamaan dengan itu, penggunaan *cell markers* seperti *Periodic Acid Schiff* (PAS) juga telah dipakai untuk mengidentifikasi PGCs pada embrio (MEYER, 1960), namun ternyata tidak mampu mengidentifikasi PGCs pada *stage* awal. Penggunaan *anti-stage-specific embryonic antigen-1* (*anti-SSEA-1*), tidak hanya mengidentifikasi PGCs, tetapi juga sel-sel lainnya sehingga tidak akurat, sedangkan penggunaan *EMA-1* hanya mampu mengidentifikasi bagian dari PGCs saja. Oleh sebab itu, *cell markers* tersebut tidak cukup spesifik untuk secara langsung menguji PGCs khususnya pada *stage* awal pengembangan embrio ayam. NAITO (2003) melaporkan bahwa *vasa gene* merupakan salah satu *specific genes* dalam *germline* yang mampu mengidentifikasi perkembangan PGCs. Akhir-akhir ini, *vasa gene* telah mendapat perhatian sebagai salah satu *molecular markers* untuk menelusuri asal-usul (*origin*) dari PGCs pada berbagai spesies. *Anti-chicken vasa homolog* (*anti-CVH*) *antibody* dapat digunakan untuk mengetahui distribusi dan populasi PGCs pada perkembangan embrio ayam. Dengan teknik tersebut maka dapat diketahui perkembangan dan distribusi PGCs pada embrio ayam mulai dari *stage* 1 sampai *stage* 17 menurut HUMBERGER dan HAMILTON, (1951).

Keberadaan PGCs pada embrio ayam berpindah-pindah sesuai dengan perkembangan embrio. NAKAMURA *et al.* (2007) mengamati perkembangan PGCs pada embrio ayam RIR (*Rhode Island Red*). Dilaporkan bahwa pada embrio ayam *stage* satu atau

baru saja ditelurkan, 100 PGCs tersebar di bagian tengah dari *area pellucida epiblast*, kemudian pada *stage* 5 atau 20 jam masa inkubasi, dengan terbentuknya *primitive streak*, PGCs bergerak ke bagian anterior dan menyebar. Karena pada awalnya PGCs berada di *area pellucida*, atau di *blastoder*, maka pemanenan PGCs dapat dilakukan pada *stage* awal di bagian *blastoderm*, sehingga disebut dengan *blastoderm* PGCs atau bPGCs (KINO *et al.*, 1997). Pada *stage* 9 atau 30 jam inkubasi, hampir seluruh PGCs ada di *epidermal ectoderm* dan di *proamion*. Pada *stage* 11, sekitar 200 PGCs berada di sirkulasi darah dan diberi nama *circulating* PGCs atau cPGCs. Pada *stage* 15 atau sekitar 55 jam inkubasi, sekitar 100 PGCs terlokalisasi di *gonadal anlage* dan berada di dalam sirkulasi darah, kemudian pada *stage* 17, PGCs yang mencapai *gonadal anlage* tampak membelah secara aktif. Keberadaan PGCs dalam sirkulasi darah hanya sebentar, dan setelah itu membentuk koloni di bagian *germinal ridge*. Pada akhirnya, PGCs membelah secara aktif membentuk ovum pada betina atau spermatozoa pada jantan (KUWANA, 1993). Penelitian ini mendemonstrasikan bahwa *whole-mount immunostaining* menggunakan *anti-CVH antibody* mampu secara efisien mendeteksi migrasi dan perkembangan PGCs pada embrio ayam. Selain itu, PGCs di *gonadal anlage* pertama kali dideteksi pada *stage* 15 dan populasinya meningkat dalam waktu pendek. Sehingga pengumpulan PGCs melalui sirkulasi darah embrio ayam yang terbaik dan terbanyak dilakukan pada *stage* 15.

PEMURNIAN PGCs PADA AYAM

KINO *et al.* (1997) melaporkan bahwa *blastoderm* dari telur ayam fertil yang tidak diinkubasi terdiri dari 40.000 sampai 60.000 sel yang secara morfologi tidak dapat dibedakan. Sel tersebut dapat diambil, diedarkan dan disuntikkan ke resipien pada *stage* pengembangan embrio yang sama (PETITTE *et al.*, 1990; 1993). Penyuntikan sel blastodermal segar ke dalam resipien embrio yang telah diiradiasi menghasilkan *chimera* yang ditunjukkan dengan bulu yang sama dengan ayam donor (CARSIENCE *et al.*, 1993; KAGAMI *et al.*, 1995). REEDY *et al.* (1995) mampu menghasilkan ayam *chimera* somatik setelah menginjeksikan sel blastodermal yang sebelumnya telah dibekukan, namun demikian frekuensi kemampuan menghasilkan *chimera* dan persentase perkembangan jaringan yang berasal dari donor lebih rendah dibandingkan dengan *chimera* yang dihasilkan dari hasil penyuntikan sel yang segar (KINO *et al.*, 1997).

ZHAO dan KUWANA (2003) berhasil mengidentifikasi dan memurnikan PGCs pada ayam dengan menggunakan metode *Nycodenz Density Gradient Centrifugation*. Teknik ini efisien dan mampu

menghasilkan PGCs dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat. Metode pemurnian PGCs ini dimulai dari pengumpulan darah embrio ayam umur 56 jam atau *stage* 14 – 16 menurut HUMBERGER dan HAMILTON (1951). Setelah itu, melalui berbagai tahapan pengenceran menggunakan berbagai konsentrasi larutan Nycodenz dan tingkatan sentrifus, maka akan diperoleh PGCs yang cukup banyak dan bersih dari sel darah merah. Metode ini telah digunakan sebagai standar pemurnian PGCs di beberapa laboratorium. MOZDZIAK (2005) mampu mengisolasi PGCs pada ayam dengan menggunakan *fluorescence-activated cell sorting*. MATSUMURA dan ENGLAND (1993) mampu mengisolasi PGCs ayam pada *stage* 4 – 8, dengan menggunakan *periodic acid-Schiff* (PAS) *staining* dan mengujinya dengan *scanning electron microscopy* (SEM).

KRIOPRESERVASI PGCs

PGCs pada unggas yang telah dikumpulkan dapat disimpan ke dalam nitrogen cair seperti halnya pada sperma, ovum atau embrio pada hewan ruminansia. Penyimpanan PGCs pada unggas akan dapat digunakan untuk konservasi materi genetik plasmanutfah unggas lokal kita untuk digunakan dalam pengembangan unggas di waktu yang akan datang dan sekaligus untuk preservasi unggas yang hampir punah.

Kriopreservasi PGCs dapat dilakukan dengan menggunakan 10% *dimethyl sulphoxide* (DMSO) atau

krioprotektan lain yang tersedia di pasaran. SETIOKO *et al.* (2007) membandingkan empat jenis krioprotektan komersial (A, B, C dan D) dan DMSO sebagai krioprotektan kontrol. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa rata-rata presentase *recovery rate* setelah pembekuan dengan menggunakan DMSO, krioprotektan A, B, C dan D masing-masing adalah 49,9, 58,2, 52,9, 46,5 dan 39,4% (Tabel 1).

Walaupun tidak ada perbedaan yang nyata antara DMSO, A, B dan C, namun ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara D dan A. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa krioprotektan A (berbasis DMSO) berbeda nyata dengan krioprotektan D yang tidak berbasis DMSO. Tidak ada perbedaan yang nyata antara semua krioprotektan yang berbasis DMSO yaitu krioprotektan A, B, C dan DMSO itu sendiri. Oleh sebab itu, agar diperoleh hasil yang baik, maka direkomendasikan menggunakan krioprotektan yang berbasis DMSO untuk preservasi PGCs pada ayam. Ini merupakan laporan yang pertama untuk mendokumentasikan keberhasilan penggunaan krioprotektan komersial untuk preservasi PGCs ayam ke dalam nitrogen cair. Pembekuan sel secara optimal untuk mendapatkan *recovery rate* yang maksimum setelah *thawing* tergantung pada berkurangnya pembentukan kristal es intraselular dan kerusakan kriogenik yang disebabkan oleh konsentrasi larutan yang tinggi yang terbentuk pada saat cairan intraselular membeku. Hal ini dapat diperoleh dengan menggunakan krioprotektan hidrofilik untuk memeras air dan dengan *thawing* secara cepat untuk

Tabel 1. Rataan persentase *recovery rate* PGCs yang telah dibekukan dan *dithawing* dengan menggunakan krioprotektan yang berbeda

Replikasi	DMSO (%)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	57,0	45,0	74,0	57,0	62,0
2	64,9	94,7	66,7	54,4	47,4
3	46,8	66,2	54,6	48,1	50,7
4	45,0	45,8	78,3	61,7	42,5
5	70,0	60,8	54,2	80,8	41,7
6	33,1	49,7	29,7	28,3	23,5
7	77,1	81,9	51,0	43,3	43,3
8	45,0	49,0	36,0	46,0	31,0
9	61,0	64,0	56,0	42,0	33,0
10	42,9	51,0	34,7	38,8	32,7
11	45,0	55,0	54,0	32,0	31,0
12	35,0	59,0	65,0	35,0	31,0
13	25,3	34,7	33,3	36,7	42,0
Rataan \pm SE	49,9 \pm 4,2 ^{ab}	58,2 \pm 4,5 ^a	52,9 \pm 4,4 ^{ab}	46,5 \pm 4,0 ^{ab}	39,4 \pm 2,9 ^b

Sumber: SETIOKO *et al.* (2007)

meminimalkan pembentukan kristal es (FRESHNEY, 2005). Persentase *recovery rate* dalam penelitian ini tergolong rendah, kemungkinan disebabkan karena pembentukan kristal es selama pembekuan, dan beberapa sel pecah karena kerusakan kriogenik. Sel yang pecah akan tercuci keluar selama disentrifus dan ini akan berpengaruh terhadap *recovery rate*. Belum ada laporan sebelumnya yang didokumentasikan tentang *recovery rate* PGCs setelah pembekuan dan *thawing*. NAITO *et al.* (1994a) telah berhasil memperoleh PGCs yang telah dibekukan dan *dithawing* dalam keadaan baik dan normal, namun mereka tidak melaporkan persentase *recovery rate*. TAJIMA *et al.* (1993) juga mampu melakukan preservasi terhadap gonadal PGCs (gPGCs) menggunakan DMSO sebagai krioprotektan, namun persentase *recovery ratenya* juga tidak dilaporkan.

Penggunaan krioprotektan dalam penelitian ini ternyata tidak berpengaruh terhadap viabilitas PGCs setelah pembekuan dan *thawing*, dan rata-rata viabilitas dengan menggunakan krioprotektan DMSO, A, B, C dan D masing-masing 83,5, 86,0, 82,3, 81,1 dan 84,8% (Tabel 2).

Hal ini menunjukkan bahwa seluruh PGCs yang diberi perlakuan dengan menggunakan krioprotektan yang berbeda masih memberikan viabilitas yang tinggi (di atas 80%) setelah pembekuan dan *thawing*. NAITO *et al.* (1994b) melaporkan bahwa viabilitas PGCs yang telah dibekukan dan *thawing* sebesar 94,2%, sedangkan KINO *et al.* (1997) melaporkan bahwa viabilitas dari blastodermal PGCs pada ayam setelah dibekukan

dengan DMSO dan *dithawing* dengan berbagai prosedur bervariasi dari 33 sampai 71%. Dapat disimpulkan dalam penelitian ini bahwa PGCs yang diambil dari darah embrio ayam dapat dibekukan dengan baik dengan menggunakan DMSO sebagai krioprotektan, dan disimpan dalam nitrogen cair tanpa mempengaruhi *recovery rate* maupun viabilitasnya.

PRODUKSI CHIMERA AYAM MELALUI INJEKSI PGCs

Konservasi plasma nutfah unggas dalam bentuk PGCs harus dapat dihidupkan kembali menjadi bentuk unggas untuk mendapatkan kembali plasma nutfah unggas yang dikonservasi. Hal ini dapat dilakukan dengan menyuntikkan kembali PGCs yang dipreservasi ke dalam embrio ayam untuk mendapatkan ayam *chimera*. Ayam *chimera* adalah ayam yang memiliki lebih dari satu populasi genetik, atau ayam yang memiliki dua atau lebih populasi sel yang secara genetik berbeda dan berasal dari *zygotes* yang berbeda (Gambar 2).

Kata *chimera* berasal dari makhluk *mythos* yang memiliki badan sebagian manusia dan sebagian binatang. Perkawinan antara *chimera* ayam jantan dan betina yang dihasilkan dari injeksi PGCs donor yang telah dibekukan dapat menghasilkan turunan yang sama dengan donor PGCs asli. REEDY *et al.* (1995) telah melakukan pendekatan untuk konservasi sumberdaya genetik dengan menghasilkan ayam *chimera* (Gambar 3).

Tabel 2. Rataan persentase viabilitas PGCs yang telah dibekukan dan *dithawing* dengan menggunakan krioprotektan yang berbeda

Replikasi	DMSO (%)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	86,0	84,4	93,2	86,0	90,3
2	91,9	92,6	86,8	87,1	89,0
3	88,9	84,3	85,7	73,0	84,6
4	90,7	90,9	93,6	87,8	90,2
5	83,3	90,4	84,6	78,4	90,0
6	85,4	81,9	90,7	82,9	88,2
7	83,8	82,4	71,7	80,0	71,1
8	77,8	91,8	83,3	82,6	83,9
9	82,0	87,5	80,4	83,3	78,8
10	88,1	78,0	79,4	81,6	84,4
11	82,2	83,6	75,9	81,3	74,2
12	74,3	83,1	63,1	74,3	87,1
13	71,1	86,5	82,0	76,4	90,5
Rataan ± SE	83,5 ± 1,7	86,0 ± 1,2	82,3 ± 2,4	81,1 ± 1,3	84,8 ± 1,8

Sumber: SETIOKO *et al.* (2007)

KINO *et al.* (1997) melaporkan bahwa sembilan dari 16 embrio (56,2%) yang disuntik dengan PGCs segar menghasilkan ayam *chimera*. Sedangkan penyuntikan PGCs yang dibekukan dan diseleksi masing-masing dengan menggunakan *Pecoll gradient* dan *Nycoprep gradient* menghasilkan 2 dari 26 embrio (7,7%) dan 3 dari 26 embrio (11,5%). Donor ayam *Barred Plymouth Rocks* (BPR) dapat direkonstitusi dengan perkawinan *inter se* yakni perkawinan jantan dan betina *chimera*. Hasil penelitian tersebut mendemonstrasikan bahwa strategi ini telah berhasil merekonstitusi sumberdaya genetik dari PGCs yang telah disimpan dalam nitrogen cair, melalui intermedia ayam *chimera*.

PENGEMBANGAN KRIOPRESERVASI PGCs YANG SUDAH DILAKUKAN DI BALITNAK

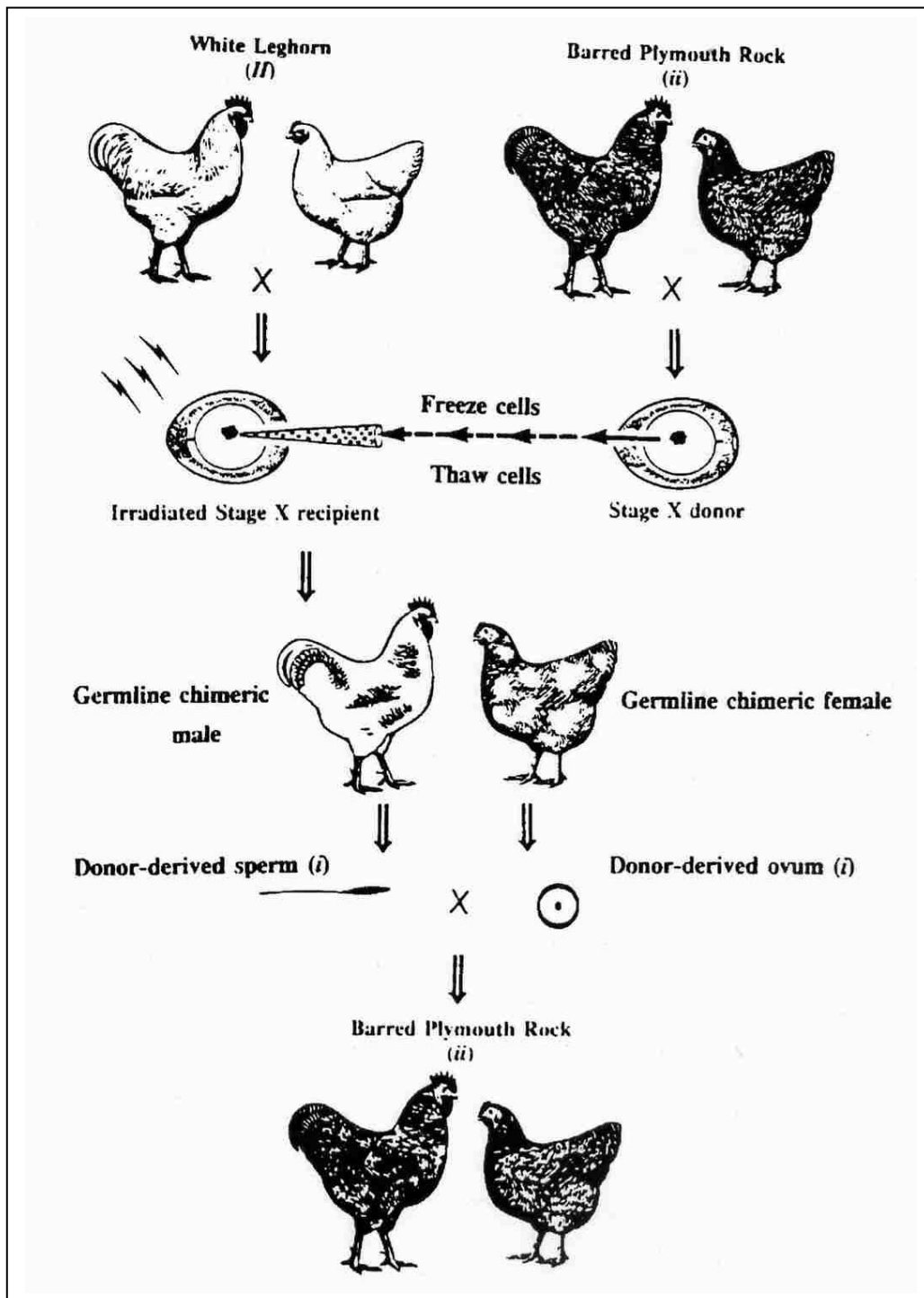
Saat ini sedang dilakukan penelitian tentang teknik pemanenan PGCs dengan menggunakan telur

ayam lokal dan ayam ras. Hasil sementara yang diperoleh adalah bahwa teknik yang dilakukan di NILGS, Tsukuba Jepang, tidak dapat sepenuhnya diadopsi pada kondisi laboratorium Balitnak, Ciawi. Hasil observasi dan konsultasi dengan pihak peneliti di Jepang menunjukkan bahwa apabila menggunakan peralatan, terutama sentrifus yang berbeda, maka diperlukan modifikasi dan penyesuaian teknik yang ada. Saat ini telah berhasil dilakukan pemurnian PGCs dari darah embrio pada tahap pertama, namun PGCs yang diperoleh masih terkontaminasi sel darah merah. Pemurnian tahap kedua, masih mengalami kendala dalam penggunaan alat sentrifus, pengaturan waktu dan kecepatan sentrifus. Diharapkan pada akhir penelitian akan diperoleh teknik pemurnian yang tepat untuk kondisi Balitnak dan jumlah PGCs per embrio baik pada ayam lokal maupun ayam ras. Untuk jangka panjang, diharapkan teknik ini dapat digunakan untuk konservasi ayam lokal Indonesia, terutama untuk jenis ayam yang hampir punah atau ayam yang tergolong langka.



Gambar 2. Ayam *chimera* yang berasal dari embrio ayam *White Leghorn* (WL) yang disuntik dengan PGCs ayam *Barred Plymouth Rock* (BPR), dimana tubuhnya adalah ayam WL dan testis (bila jantan) atau ovarium (bila betina) adalah ayam BPR. Ciri ayam tersebut adalah adanya warna *barret* pada bagian punggung. Perkawinan *inter se chimera* jantan dan betina akan menghasilkan keturunan ayam donor PGCs yaitu BPR

Sumber: Foto diambil dari *National Institute of Livestock and Grassland Science* (NILGS), Tsukuba, Jepang



Gambar 3. Strategi untuk konservasi sumberdaya genetik menggunakan *chimeras* yang dibuat dari *blastodermal primordial germcells* (bPGCs) yang telah dibekukan sebelumnya. Embrio pada ayam *Barred Plymouth Rocks* (BPR) pada *stage X* (EYAL-GILADI dan KOCHAV, 1976) diambil bPGCs-nya kemudian dibekukan. Setelah disimpan dalam nitrogen cair, sel tersebut *dithawing* kemudian diinjeksikan ke dalam embrio ayam White Leghorn pada *stage X* yang telah diradiasi sebelumnya. Setelah telur tersebut ditetaskan, maka akan dihasilkan ayam *chimera* dan kemudian dibesarkan hingga dewasa kelamin. Perkawinan ayam *chimera* jantan dan betina akan menghasilkan keturunan yang berasal seluruhnya dari donor PGCs yaitu ayam BPR

Sumber: REEDY *et al.* (1995)

KESIMPULAN

1. Konservasi sumberdaya genetik hewan hidup, baik secara *in-situ* maupun *ex-situ* merupakan hal penting, namun biayanya akan sangat mahal.
2. Kriopreservasi yang telah dikembangkan pada embrio hewan mamalia tidak dapat diaplikasikan pada unggas karena telur unggas memiliki struktur yang besar dan kompleks.
3. Pendekatan untuk rekonstruksi sumberdaya genetik pada unggas melalui penyuntikan PGCs yang dibekukan sebelumnya pada unggas telah dikembangkan dan menghasilkan ayam *chimera*.
4. Pembekuan PGCs dengan menggunakan krioprotektan DMSO atau krioprotektan komersial yang berbasis DMSO terbukti mampu menghasilkan *recovery rate* dan viabilitas PGCs yang baik.
5. Perkawinan *inter se* antar ayam *chimera* hasil dari injeksi PGCs akan menghasilkan turunan yang seluruhnya sama (rekonstruksi) dengan stok asli PGCs yang disuntikkan.

DAFTAR PUSTAKA

- BLESBOIS, E. and C. LABBÉ. 2003. Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. *In: Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*. PLANCHENAUT, D. (Ed.). Paris 2003 pp. 55 – 65.
- BOUSSEAU, S., J.P. BRILLARD, LE MARGUANT, B. GUIENNE, B. GUERIN, A. CAMUS and M. LECHAT. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699 – 706.
- CABRITA, E., R. ALVAREZ, L. ANEL, K.J. RANA and M.P. HERRAEZ. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37: 245 – 253.
- CARSIENCE, R.S., M.E. CLARK, A.M. VERRINDER GIBBINS and R.J. ETCHES. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117: 669 – 675.
- EYAL-GILADI, H. and S. KOCHAV. 1976. From cleavage to primitive streak formation : a complementary normal table and a new look at the first stage of the development of the chick. I. General Morphology. *Dev. Biol.* 49: 321 – 337.
- FAO. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FRESHNEY, R.I. 2005. Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique. 5th Edition. Wiley-Liss. Inc., Hoboken.
- HAGEDORN, M., A. PETERSON, P. MAZUR and F.W. KLEINHANS. 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. *Cryobiology* 49: 181 – 189.
- HAMMERSTEDT, R.H. and J.K. GRAHAM. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26 – 38.
- HIEMSTRA, S.J., T. VAN DER LANDE and H. WOELDER. 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. Proc. of the Role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy, 5 – 7 March 2005. pp. 25 – 35.
- HUMBERGER, V. and H.L. HAMILTON. 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphology* 8: 49 – 92.
- KAGAMI, H., M.E. CLARK, A.M. VERRINDER GIBBINS and R.J. ETCHES. 1995. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 379 – 387.
- KINO, K., B. PAIN, S.P. LEIBO, M. COCHRAN, M.E. CLARK and R.J. ETCHES. 1997. Production of chicken *chimeras* from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.* 76: 753 – 760.
- KUWANA, T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Development, Growth and Differentiation* 35: 237 – 243.
- MATSUMURA, G. and M.A. ENGLAND. 1993. Isolation of chick primordial germ cells from stages 4 – 8 embryos. *The Anatomical Record*. 235(4): 604 – 610.
- MAZUR, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. Proc. of the First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, 1985. pp. 91 – 111.
- MAZUR, P., S.P. LEIBO and E.H. CHU. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell Res.* 71: 345 – 355.
- MEYER, D.B. 1960. Application of periodic acid schiff technique to whole chick embryo. *Stain Technol.* 35: 83 – 89.
- MOZDZIAK, P.E., J. ANGERMAN-STEWART, B. RUSHTON, S.L. PARDUE and J.N. PETITTE. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84(4): 594 – 600.
- NAITO, M.A., T. TAJIMA, Y. TAGAMI, T. YASUDA and KUWANA. 1994a. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J. Reprod. Fertility* 102: 321 – 325.
- NAITO, M., A. TAJIMA, Y. YASHUDA and T. KUWANA. 1994b. Production of germline chimeric chicken, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 39:153 – 161.
- NAITO, M. 1997. The microinjection of DNA into early chicken embryo. *In: Transgenic Animals: Generation*

- and Use. HOUBEINE, L.M. (Ed.) Harwood Academy Publishers, The Netherland. pp: 69 – 73.
- NAITO, M. 1998. Manipulation of primordial germ cells for avian transgenic. *Ag. Biotech News and Information* 10: 397 – 404.
- NAITO, M. 2003. Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *J. Poult. Sci.* 40: 1 – 12.
- NAKAMURA, Y., Y. YAMAMOTO, F. USUI, T. MUSHIKA, T. ONO, A.R. SETIOKO, K. TAKEDA, K. NIRASAWA, H. KAGAMI and T. TAGAMI. 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.* 86: 2182 – 2193.
- NATAAMIJAYA, A.G. 2000. The native chicken of Indonesia. *Bull. Plasma Nutfah* 6(1): 1 – 6.
- PETITTE, J.N., M.E. CLARK, G. LIU, A.M. VERRINDER GIBBINS and R.J. ETCHES. 1990. Production of somatic and germline *chimeras* in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108: 185 – 189.
- PETITTE, J.N., C.L. BRAZOLOT, M.E. CLARK, G. LIU, A.M. VERRINDER GIBBINS and R.J. ETCHES. 1993. Accessing the genome of the chicken using germline *chimeras*. *In: Manipulation of the Avian Genome*. ETCHES, R.J. and A.M. VERRINDER GIBBINS (Eds.). CRC Press, Boca Raton. pp. 81 – 101.
- REEDY, S.E., S.P. LEIBO, M.E. CLARK and R.J. ETCHES. 1995. Beyond freezing semen. *Proc. First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association. Savoy, IL. pp. 251 – 261.
- SARTIKA, T. dan S. ISKANDAR. 2007. Mengenal plasma nutfah ayam Indonesia dan pemanfaatannya. Balai Penelitian Ternak, Puslitbang Peternakan, Badan Litbang Pertanian. 140 hlm.
- SETIOKO, A.R., T. TAGAMI, H. TASE, Y. NAKAMURA, K. TAKEDA and K. NIRASAWA. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryo using commercial cryoprotectants. *J. Poult. Sci.* 44: 73 – 77.
- TAJIMA, A., M. NAITO, Y. YASUDA and T. KUWANA. 1993. Production of germline *chimera* by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40: 509 – 519.
- TAGAMI, T., H. KAGAMI, Y. MATSUBARA, T. HARUMI, M. NAITO, K. TAKEDA, H. HANADA and K. NIRASAWA. 2007. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 68 – 75.
- WISHART, G.J. 1985. Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poult. Sci.* 26: 375 – 380.
- WOELDERS, H. and A. CHAVEIRO. 2004. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology* 49: 258 – 271.
- WOELDERS, H., C.A. ZUIDBERG and S.J. HIEMSTRA. 2003. Applications, limitations, possible improvements and future of cryopreservation for livestock species. *Proc. of the Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*. Paris, February 23rd 2003: 67 – 76.
- YASUDA, Y., A. TAGIMA, T. FUJIMOTO and T. KUWANA. 1992. A method to obtain avian germline *chimeras* using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fertility* 96: 521 – 528.
- ZHAO, D.F. and T. KUWANA. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *Brit. Poult. Sci.* 44: 30 – 35.