

Pembentukan *Germline Chimera* Ayam Gaok Menggunakan *Primordial Germ Cell* Sirkulasi Segar dan Beku

Kostaman T¹, Yusuf TL², Fahrudin M³, Setiadi MA², Setioko AR¹

¹Balai Penelitian Ternak, Badan Litbang Pertanian, PO Box 221, Bogor 16002,
E-mail: tatankostaman@gmail.com

²Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Diterima 27 Desember 2013 ; disetujui 30 Februari 2014)

ABSTRACT

Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA, Setioko AR. 2014. Formation of *Germline Chimera* Gaok chicken used circulation Primordial Germ Cells (circulation PGCs) fresh and thawed. JITV 19(1): 17-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.990>

Formation of germline chimeras by transfer of chicken primordial germ cells (PGCs) is one of the effective techniques for preservation and regeneration of genetic resources in chickens. This study attempted to form germline chimeras of Gaok chicken by purifying circulated PGCs of donor embryo before it is transferred to the recipient (White Leghorn chickens = WL) and study the ability of recipient embryo on survival in incubators, and hatchability. In this study 200 fertile eggs of Gaok and 90 fertile WL breed were incubated at 38°C and 60% humidity in a portable incubator. PGCs-circulation of the blood collected Gaok embryos at stage 14-16 were taken from the dorsal aorta, and then purified by centrifugation method using nycodenz. PGCs-circulation results further purification frozen in liquid nitrogen before being transferred to the recipient embryo. Results showed that for the development of embryos transferred to the fresh circulation of PGCs-circulation as many as 25 cells can survive up to day 14, while one of the transferred of 50 and 100 cells into recipient embryos hatched (10%). On the contrary recipient embryos that are transferred by the frozen PGCs-circulation the embryos development was shorter, and only survived until day 10th (treatment 25 cells), day 14th (treatment of 50 cells) and day 17th (treatment of 100 cells). It is concluded that the amount of PGCs-circulation embryos transferred to the recipient is one factor that influence the success of the development germline chimeras.

Key Words: Gaok Chicken, White Leghorn Chicken, Circulated PGCs, Transfer, *Germline Chimera*

ABSTRAK

Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA, Setioko AR. 2014. Pembentukan *Germline Chimera* ayam Gaok menggunakan *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) segar dan beku. JITV 19(1): 17-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i1.990>

Pembentukan germline chimera ayam dengan cara transfer *Primordial Germ Cell* (PGC) adalah salah satu teknik yang efektif untuk preservasi dan regenerasi sumber genetik pada ayam. Pada penelitian ini dicoba untuk membentuk *Germline Chimera* ayam Gaok dengan cara memurnikan terlebih dahulu PGC-sirkulasi donor sebelum ditransfer ke embrio resipien (ayam White Leghorn=WL) dan dilihat bagaimana kemampuan embrio resipien dapat bertahan hidup pada mesin inkubator, serta daya tetas. Dalam penelitian ini digunakan 200 butir telur fertil ayam Gaok dan 90 butir telur fertil ayam WL, yang masing-masing diinkubasi pada suhu 38°C dan kelembaban 60% dalam inkubator portable. PGC-sirkulasi ayam Gaok dikoleksi dari darah embrio pada stadium 14-16 yang diambil dari bagian *aorta dorsalis*, kemudian dimurnikan dengan metode sentrifugasi menggunakan nycodenz. PGC-sirkulasi hasil pemurnian selanjutnya dibekukan di liquid nitrogen sebelum ditransfer ke embrio resipien. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk perkembangan embrio yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 25 sel dapat bertahan hidup sampai hari ke-14, sedangkan yang ditransfer dengan 50 dan 100 sel ke embrio resipien berhasil menetas masing-masing sebanyak satu ekor (10%). Sebaliknya embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi beku perkembangan embrionya lebih singkat, yaitu hanya mampu bertahan hidup sampai hari ke-10 (perlakuan 25 sel), hari ke-14 (perlakuan 50 sel) dan hari ke-17 (perlakuan 100 sel). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah PGC-sirkulasi yang ditransfer ke embrio resipien merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembentukan *Germline Chimera*.

Kata Kunci: Ayam Gaok, Ayam White Leghorn, PGC-Sirkulasi, Transfer, *Germline Chimera*

PENDAHULUAN

Ayam *chimera* telah dilaporkan menjadi hewan yang baik untuk mempelajari perkembangan individu ayam, namun masih terdapat hambatan. Hambatannya adalah embrio ayam yang ditutupi oleh sebagian besar kuning telur akan menyulitkan untuk memulihkan dan memanipulasi embrio. Melihat permasalahan tersebut banyak peneliti telah melaporkan pembentukan ayam *chimera* dengan menggunakan PGC sebagai donor untuk ditransfer ke embrio sebagai penerima (resipien) (Furuta et al. 2007). Pembentukan ayam *chimera* mempunyai arti penting untuk penelitian fisiologi, tingkah laku dan biologi perkembangan.

Primordial Germ Cell (PGC) adalah nenek moyang dari spermatozoa dan sel telur dan dapat membawa informasi genetik tetua untuk keturunan mereka. Pada awalnya PGC terdapat di area pelusida pada tahap X *blastoderm* (telur segar). Pada saat inkubasi dan perkembangan selanjutnya, PGC dapat ditemukan di daerah ekstraembrionik yang disebut *germinal crescent*. PGC kemudian masuk dan beredar di dalam pembuluh darah dari embrio dan bermigrasi ke bakal gonad, yang berkembang menjadi gonad dewasa (Nakamura et al. 2007). Jalur migrasi yang unik dari PGC melalui aliran darah dapat dimanfaatkan untuk produksi *Germline Chimera* melalui transfer ke dalam pembuluh darah embrio resipien. Apalagi beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa PGC yang sudah diisolasi bisa ditransfer ke embrio resipien pada tahap di mana PGC beredar dalam darah tanpa kehilangan kemampuan untuk berkontribusi pada pembentukan sel *germ* (Kim et al. 2004; Mozdziaik et al. 2006). Selain itu, diharapkan penggunaan PGC dapat meningkatkan efisiensi penyebaran *germline* karena PGC adalah leluhur dari sel telur dan spermatozoa.

Pembentukan *Germline Chimera* ayam dengan cara transfer PGC adalah salah satu teknik yang efektif untuk preservasi dan regenerasi sumber genetik pada ayam, serta sebagai alat untuk memahami mekanisme dasar perkembangan *germline* unggas. Selain itu, *Germline Chimera* mempunyai aplikasi yang sangat potensial untuk generasi unggas transgenik, untuk konservasi spesies yang terancam punah dan untuk melakukan perubahan seks rasio pada industri unggas pedaging.

Penelitian ini merupakan upaya awal untuk penerapan teknologi transfer PGC-sirkulasi di bidang peternakan di Indonesia. Sebagai model hewan donor digunakan ayam Gaok dan sebagai model hewan resipien digunakan ayam White Leghorn (WL). Ayam Gaok digunakan sebagai model hewan donor karena ayam Gaok adalah ayam yang populasinya semakin lama semakin berkurang di daerah asalnya, yaitu di Kabupaten Madura. Ayam WL dijadikan sebagai model

hewan resipien untuk aplikasi transfer PGC-sirkulasi karena ayam WL sangat produktif dan mampu beradaptasi dengan semua kondisi lingkungan.

Kematian embrio merupakan persentase kematian embrio yang terjadi selama masa inkubasi. Feng et al. (2006) melaporkan ada dua periode kritis yang menyebabkan kematian embrio selama di inkubator, yaitu perkembangan embrio pada saat *prophase* (hari kesatu sampai hari keenam) dan pada saat perkembangan embrio memasuki *anaphase* sampai menetas (setelah hari ke-18). Angka kematian embrio pada *anaphase* lebih tinggi daripada *prophase*, ini dapat dikaitkan dengan embrio yang lebih rentan terhadap perubahan lingkungan eksternal, karena pada waktu ini embrio sedang menjalani perubahan lingkungan internal.

Selain faktor di atas, yang dapat mempengaruhi kematian embrio selama di inkubator, yaitu dapat disebabkan oleh besar kecilnya kuning telur. Menurut Ayanwale (2006) meningkatnya pembentukan kuning telur akan mempengaruhi kepada bobot kuning telur, sehingga sangat menguntungkan untuk perkembangan embrio karena kuning telur merupakan sumber asupan nutrisi bagi embrio. Kuning telur mengandung cadangan nutrisi yang cukup tinggi seperti protein, lemak, vitamin, mineral dan air.

Pada penelitian ini dicoba untuk membentuk *Germline Chimera* ayam Gaok dengan cara memurnikan terlebih dahulu PGC-sirkulasi donor sebelum ditransfer ke embrio resipien (ayam WL) dan dilihat bagaimana kemampuan embrio resipien bertahan hidup pada mesin inkubator, serta daya tetas dari embrio resipien.

MATERI DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

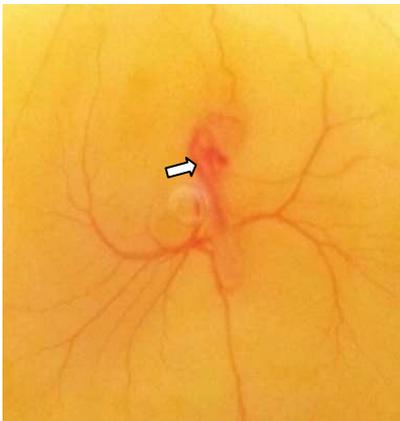
Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi, Balai Penelitian Ternak, Ciawi-Bogor dan Laboratorium Fertilisasi In Vitro, Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dimulai dari bulan Februari 2012 sampai bulan Desember 2012.

Penyiapan telur ayam Gaok dan White Leghorn

Sebanyak 200 telur fertil ayam Gaok sebagai donor dan 90 butir telur fertil ayam WL sebagai resipien, diinkubasi pada suhu 38°C dengan kelembaban 60% dan diputar 90° setiap 15 menit menggunakan inkubator portable (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Jepang). Telur ayam Gaok dan WL diinkubasi sampai mencapai umur embrio pada stadium 14-16 atau 2,5-3 hari (Hamburger & Hamilton 1951).

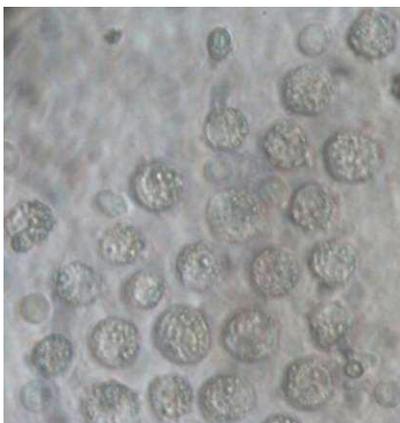
Koleksi donor *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) segar ayam Gaok

Telur ayam Gaok yang sudah mencapai perkembangan embrio pada stadium 14-16, kerabang telur dipecahkan dan isi telur dipindahkan ke plastik *petri dish* (90 x 15 mm, LBS60001PT, BIOLAB). Pengambilan darah dilakukan melalui bagian *aorta dorsalis* dengan menggunakan mikropipet (diameter bagian dalam = 30 μm) di bawah mikroskop (Olympus SZ30, Jepang) (Gambar 1). Darah yang terkumpul ditempatkan pada tabung *ependorf* 1,5 ml yang telah diisi dengan 1000 μl larutan tanpa Ca^{2+} dan Mg^{2+} (PBS -) dalam 10% *fetal bovine serum* (FBS, 26140 Gibco). Prosedur pemurnian PGC-sirkulasi ayam gaok dengan metode gradien sentrifugasi menggunakan *nycodenz* (Prod. No. 1002424, Axis-Shield Poc AS) dengan sedikit modifikasi (Zhao dan Kuwana 2003). Hasil dari pemurnian akan digunakan untuk koleksi PGC-sirkulasi segar dan PGC-sirkulasi untuk dibekukan (Gambar 2).



Gambar 1. Daerah *aorta dorsalis* (anak panah putih) untuk pengambilan sampel darah embrio

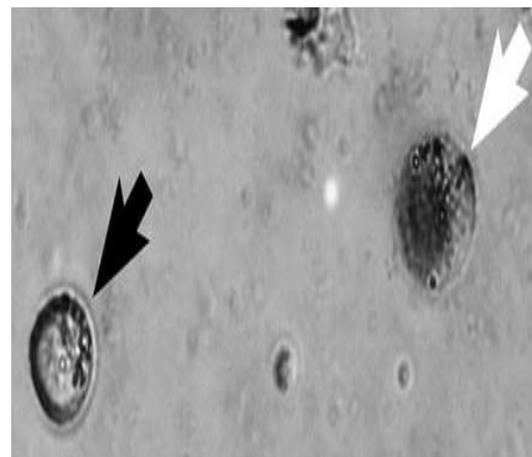
Sumber: Yang & Kim 2012



Gambar 2. PGC-sirkulasi donor hasil pemurnian. Pembesaran 400 x

Koleksi donor *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) beku ayam Gaok

PGC-sirkulasi hasil pemurnian dan yang layak dibekukan (bulat, tidak cacat, ukuran sama besar, simetris dan transparan), kemudian diencerkan dengan krioprotektan DMSO 5%. PGC-sirkulasi dikemas ke dalam *straw* 0,25 ml, di mana setiap *straw* berisi 100 sel. Proses pembekuan menggunakan mesin pembekuan (merk FHK Fujihara: ET-1, Jepang). PGC-sirkulasi beku yang akan ditransfer, di *thawing* terlebih dahulu sesuai dengan prosedur dari Setioko et al. (2007). Setelah *thawing*, koleksi PGC-sirkulasi beku selanjutnya dievaluasi dan akan diperoleh koleksi PGC-sirkulasi hidup yang akan ditransfer ke embrio resipien (Gambar 3).



Gambar 3. Karakteristik morfologi PGC-sirkulasi sesudah pembekuan. PGC-sirkulasi hidup (anak panah hitam), PGC-sirkulasi mati (anak panah putih). Pembesaran 400 kali

Sumber: Kohara et al. (2008)

Transfer *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi)

Ada dua perlakuan transfer donor PGC-sirkulasi, yaitu:

1. Embrio resipien ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi segar (25, 50 dan 100 sel), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali
2. Embrio resipien ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi beku (25, 50 dan 100 sel), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Kriteria dari embrio resipien yang akan digunakan adalah embrio harus normal, pembuluh darah terlihat jelas, kuning telur besar dan tidak pecah.

Tahapan transfer donor PGC-sirkulasi segar dan beku ke embrio resipien dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Pada telur resipien (WL), kerabang telur yang tumpul dibuat lubang kecil, dengan tujuan agar udara yang ada diruang udara ke luar sehingga akan memudahkan pada waktu manipulasi embrio resipien. Selanjutnya telur dibalik, sehingga bagian kerabang yang tumpul ada di bawah dan bagian kerabang yang runcing ada di atas.
2. Bagian kerabang yang runcing kemudian dibuat *window* atau lubang (diameter 1,5 sampai 2 cm) hingga embrio terlihat dengan tujuan untuk memudahkan manipulasi embrio karena pada bagian kerabang telur yang runcing adalah tempat jatuhnya posisi embrio.
3. Setelah embrio resipien terlihat, dengan menggunakan mikropipet (30 μm) di bawah mikroskop (Olympus SZ30, Jepang) seluruh darah embrio resipien diambil dari bagian *aorta dorsalis*. Kemudian melalui *spot* yang sama ditransfer donor PGC-sirkulasi (yang sudah disiapkan) ke embrio resipien.
4. Selanjutnya *window* dari telur resipien ditutup dengan *cling film*.
5. Telur embrio resipien diinkubasi pada suhu 38°C dengan kelembaban 60% dan diputar 90° setiap 15 menit menggunakan inkubator portable (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Jepang) selama 21 hari.

Pengamatan perkembangan embrio resipien ayam White Leghorn

Kriteria yang digunakan untuk mengetahui embrio donor yang ditransfer ke embrio resipien dikatakan masih hidup dan berkembang secara normal di bawah mikroskop adalah dengan cara sebagai berikut:

1. Umur embrio 4-7 hari, yaitu dengan melihat denyut jantungnya, dan mulai ada perkembangan organ, seperti mata, paruhnya sudah terlihat seperti bintik gelap pada dasar mata, sudah mulai terbentuk otak, leher dan jengger.
2. Umur embrio 10-14 hari, yaitu dengan melihat denyut jantung, paruh mulai keras dan folikel bulu embrio mulai terbentuk, punggung telah tampak meringkuk atau melengkung. Sementara bulu hampir menutupi seluruh tubuhnya.
3. Umur embrio 17 sampai 20 hari, yaitu dengan melihat denyut jantung, embrio sudah tampak jelas seperti ayam, akan mempersiapkan diri untuk menetas. Jari kaki, sayap dan bulunya berkembang dengan baik. Embrio ayam ini hampir menempati seluruh rongga di dalam telur.

Peubah yang diamati

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah kemampuan embrio resipien bertahan hidup pada tahapan perkembangan embrio hari ke-4, 7, 10, 14, 17 dan 20 dimesin inkubator, serta daya tetas telur resipien.

Analisis statistik

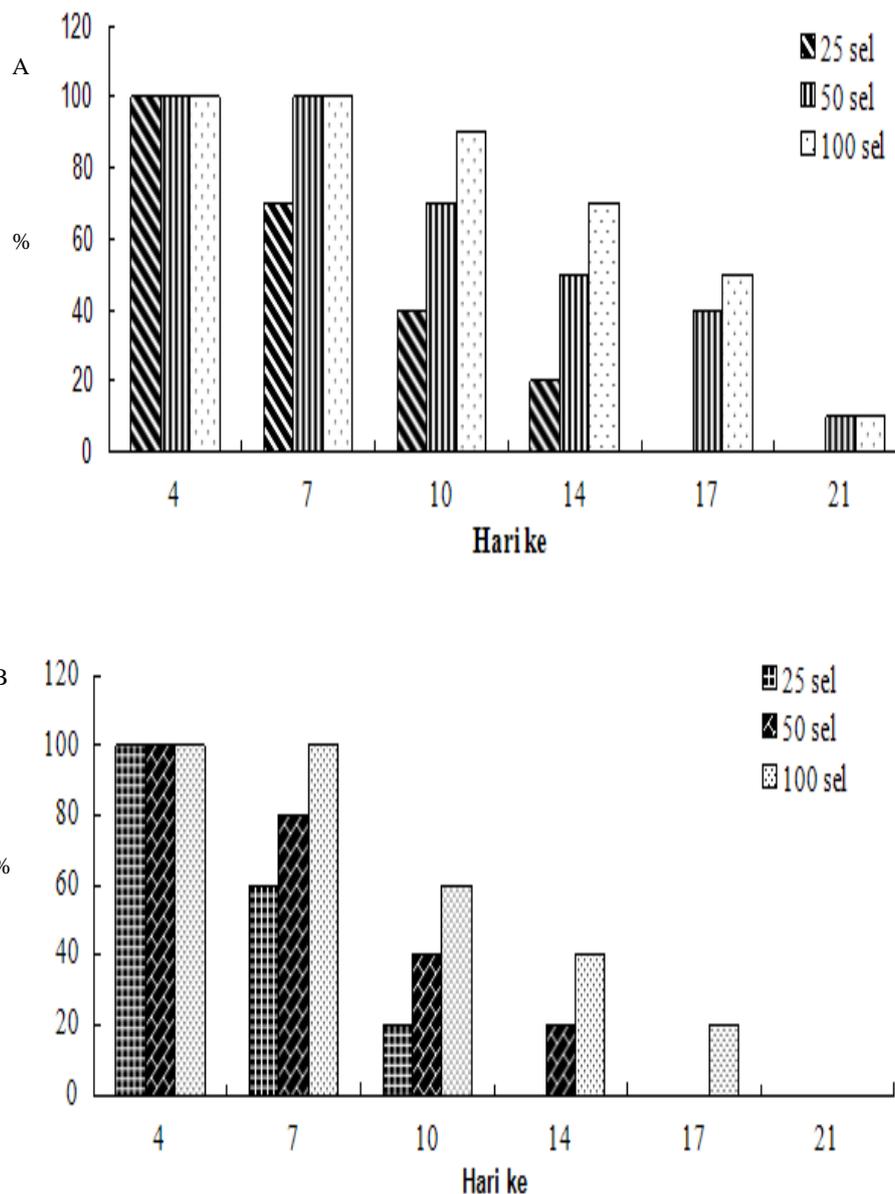
Data yang diperoleh dari perkembangan embrio resipien dilakukan secara deskripsi yang dinyatakan dalam persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transfer donor *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) segar dan beku

Perkembangan embrio pada penelitian ini diamati secara kontinyu pada seluruh perlakuan (25, 50 dan 100 sel) pada umur inkubasi 4-21 hari. Perkembangan embrio yang diamati setiap periode pada perlakuan 25, 50 dan 100 sel menunjukkan perkembangan yang sama pada hari keempat inkubasi yaitu masih mampu bertahan hidup di embrio resipien sebesar 100% (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa sampai dengan pengamatan hari keempat, faktor jumlah sel yang ditransfer belum menjadi faktor pembatas untuk perkembangan embrio. Dengan demikian embrio untuk semua perlakuan pada tahap ini sudah dapat melalui periode kritis pertama, yaitu hari ketiga sampai hari keempat sesuai dengan hasil penelitian Sukra (2000). Pengamatan perkembangan embrio pada hari ketujuh, perlakuan transfer PGC-sirkulasi segar sebanyak 50 dan 100 sel dan transfer PGC-sirkulasi beku sebanyak 100 sel menunjukkan embrio resipien masih mampu bertahan hidup dan berkembang sebesar 100%. Sementara itu, embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi beku sebanyak 50 sel mengalami penurunan sebesar 20% (4/5) dan yang ditransfer PGC-sirkulasi sebanyak 20 sel baik yang segar maupun yang beku mengalami penurunan berturut-turut sebesar 30% (7/10) dan 40% (3/5). Akan tetapi hasil transfer PGC-sirkulasi segar pada penelitian ini untuk perlakuan 25 dan 50 sel masih lebih baik dibandingkan dengan hasil penelitian Kuwana et al. (2006), melaporkan bahwa embrio resipien yang ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi segar sebanyak 60 sel hanya mampu bertahan hidup selama 4 hari.

Pada pengamatan perkembangan embrio resipien hari ke-10 untuk ketiga perlakuan persentase kematian embrio terjadi peningkatan yang cukup tinggi terutama untuk embrio resipien yang ditransfer PGC-sirkulasi beku.



Gambar 4. Persentase perkembangan embrio donor yang ditransfer ke embrio resipien White Leghorn
A = PGC-sirkulasi segar, B=PGC-sirkulasi beku

Embrio resipien yang ditransfer PGC-sirkulasi segar sebanyak 25 dan 50 sel, yaitu sebesar 30% dan 70% dan yang ditransfer PGC-sirkulasi beku sebesar 20% dan 40%. Sementara itu, perlakuan embrio yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 100 sel, masih sangat bagus yaitu sebesar 90% sedangkan yang ditransfer PGC-sirkulasi beku tinggal 60%. Sesuai dengan penelitian Sukra (2000), kematian embrio pada hari ke-10 termasuk periode kritis kedua. Faktor yang menyebabkan kematian embrio pada periode ini ada hubungannya dengan gangguan penarikan kantung kuning telur ke dalam rongga perut. Pada hari ke-10 ini

makanan embrio berasal dari sebagian besar albumen dan sebagian kecil dari kuning telur, sehingga apabila ada gangguan dari penarikan kuning telur embrio akan kekurangan makanan karena kecukupan nutrisi untuk embrio tidak bisa apabila hanya mengandalkan dari albumen. Hal ini disebabkan kandungan albumen hanya tersusun dari air, protein dan beberapa mineral (Yuwanta 2010).

Pada hari ke-14 kematian embrio resipien semakin banyak, perlakuan 25 sel PGC-sirkulasi segar yang mampu bertahan hidup tinggal 20% (2/10) sedangkan untuk embrio yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi

beku semua embrio resipien mengalami kematian. Perlakuan transfer PGC-sirkulasi segar sebanyak 50 sel mengalami penurunan hingga 50%. Sementara itu, yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi beku embrio resipien yang mampu bertahan hidup sebesar 20% (1/5). Embrio resipien yang ditransfer PGC-sirkulasi segar sebanyak 100% yang bertahan hidup masih cukup bagus yaitu 70%, sedangkan yang ditransfer PGC-sirkulasi beku tinggal 40%. Hal ini disebabkan, pada hari ke-14 makanan utama dari embrio adalah kuning telur dan sebagian kecil dari albumen, apabila gangguan proses penarikan kantung kuning telur ke dalam rongga perut pada hari ke-10 terus berlanjut sampai dengan hari ke-14 maka makanan utama dari embrio tidak akan tersedia (Sukra 2000). Menurut Ayanwale (2006) kuning telur merupakan sumber asupan nutrisi bagi embrio. Kuning telur mengandung cadangan nutrisi yang cukup tinggi seperti protein, lemak, vitamin, mineral dan air. Kematian embrio pada hari ke-14 juga bisa disebabkan karena induk kekurangan makanan (Ensminger et al. 2004).

Akhirnya pada pengamatan embrio hari ke-17 untuk perlakuan transfer 25 sel, embrio tidak mampu melewati periode kritis yang ketiga karena semua embrio resipien mengalami kematian. Sesuai dengan hasil penelitian Sukra (2000), Feng et al. (2006) dan Mulyantini (2010) bahwa tiga hari terakhir masa inkubasi persentase kematian embrio paling tinggi, hal ini ada hubungannya dengan waktu dan posisi embrio, di mana paruh belum memutar ke rongga udara sehingga embrio akan kekurangan oksigen. Untuk perlakuan embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 50 sel, embrio resipien yang mampu bertahan hidup tinggal 40% (4/10). Sementara, embrio yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 100 sel embrio resipien yang mampu bertahan hidup sebesar 50% (5/10). Embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi beku sebanyak 50 sel embrio semuanya mati, sedangkan yang ditransfer dengan 100 sel embrio yang mampu bertahan hidup sebesar 20% (1/5).

Perkembangan embrio pada hari ke-20, untuk embrio yang ditransfer dengan 50 dan 100 sel PGC-sirkulasi segar terjadi penurunan sebesar 30%. Embrio resipien yang ditransfer dengan 100 sel PGC-sirkulasi beku tidak mampu melewati periode kritis ketiga karena semua embrio resipien mengalami kematian. Hal ini disebabkan adanya komplikasi antara pengeringan *chorioalantois* dan tarikan kantong kuning telur ke dalam tubuh embrio sewaktu menetas (Sukra 2000). Menyebabkan embrio tidak mendapatkan cukup makanan yang berasal dari kuning telur karena suplai nutrisi yang berasal dari albumen akan habis pada hari ke-16. Diperkuat oleh Feng et al. (2006) bahwa perkembangan embrio di inkubator sampai dengan hari ke-19 angka kematiannya paling tinggi, karena pada

hari ke-19 embrio lebih rentan terhadap perubahan lingkungan eksternal. Hal ini ada hubungannya dengan proses-proses fisiologi yang mengambil tempat selama perkembangan. Di samping itu, kecepatan tumbuh dan perkembangan bentuk besar berubah dengan cepat selama awal masa pengeraman, sementara konsentrasi zat padat dan proses kimia berubah sangat besar selama akhir dari pertengahan masa pengeraman. Dengan kondisi demikian embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar yang mampu bertahan hidup tinggal 10 dan 20%.

Embrio resipien yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar yang mampu bertahan hidup sampai pengamatan hari ke-21 dan berhasil menetas, untuk perlakuan 50 dan 100 sel hasilnya masih kurang memuaskan karena hanya sebesar 10% (1/10). Pada hari ke-21, ayam akan keluar dari cangkang telur dengan memecah cangkang pada bagian kantung udara. Kantung alantois yang sebelumnya sebagai alat respirasi selama proses inkubasi akan mengering dan pernafasan berlangsung menggunakan paru-paru.

Saat pertumbuhan dan perkembangan embrio, adanya saat-saat tertentu yang merupakan masa kritis kehidupan embrio, di mana masa kritis itu berdasarkan persentase kematian embrio terbesar. Pada penelitian ini masa kritis perkembangan embrio untuk perlakuan 25, 50 dan 100 sel yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar berturut-turut adalah pada hari ke-10, 14 dan 17. Untuk perlakuan PGC-sirkulasi beku masa kritis perkembangan embrio lebih singkat, yaitu hari ke-10 untuk perlakuan 25 dan 50 sel, serta hari ke-14 untuk perlakuan 100 sel.

Dibandingkan dengan perlakuan donor PGC-sirkulasi segar, donor PGC-sirkulasi beku mendapatkan hasil yang kurang memuaskan karena Sampai dengan pengamatan perkembangan embrio hari ke-21 tidak ada embrio resipien yang mampu bertahan hidup atau menetas. Hal ini diduga PGC-sirkulasi beku sudah mengalami penurunan kualitas, karena PGC-sirkulasi harus melewati beberapa tahap seperti tahap pembekuan, *thawing* dan sentrifugasi sebelum ditransfer ke embrio resipien.

Pembentukan *Germline Chimera* yang diransfer dengan *Primordial Germ Cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) segar dan beku ayam Gaok

Hasil penelitian untuk pembentukan *Germline Chimera* relatif masih rendah, hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh jumlah donor PGC-sirkulasi yang ditransfer ke embrio resipien, yaitu hanya 25 sampai 100 sel (Tabel 1). Sementara hasil penelitian Kuwana et al. (2006), Nakamura et al. (2009) mentransfer donor PGC segar ke embrio resipien sebanyak 100 sampai 232 sel; sedangkan untuk donor PGC beku sebanyak 100 sampai 500 sel (Naito et al. 1994; Kino et al. 1997).

Tabel 1 Perkembangan embrio donor hasil transfer PGC-sirkulasi segar dan beku pada resipien White Leghorn

Jumlah PGC (sel)	Perkembangan embrio sampai hari ke-						Menetas (%)
	4	7	10	14	17	20	
----- N (%) -----							
Segar:							
25	10 (100)	7 (70)	4 (40)	2 (20)	Mati	-	0 (0)
50	10 (100)	10 (100)	7 (70)	5 (50)	4 (40)	1 (10)	1 (10)
100	10 (100)	10 (100)	9 (90)	7 (70)	5 (50)	2(20)	1 (10)
Beku:							
25	5 (100)	3 (60)	1 (20)	Mati			0 (0)
50	5 (100)	4 (80)	2 (40)	1 (20)	Mati		0 (0)
100	5 (100)	5 (100)	3 (60)	2 (40)	1 (20)	Mati	0 (0)

Menurut Kim et al. (2010) jumlah donor PGC yang ditransfer ke embrio resipien merupakan salah satu faktor kritikal untuk meningkatkan keberhasilan pembentukan *Germline Chimera*. Selain dari jumlah donor PGC, faktor yang juga sangat mempengaruhi keberhasilan pembentukan *Germline Chimera* adalah konsisten keahlian (*skill*) yang tinggi (Nakamura et al. 2009).

Pembentukan *Germline Chimera* ayam Gaok pada penelitian ini hanya menghasilkan 1 dari 10 embrio (10%) baik yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 50 dan 100 sel (Gambar 5). Dibandingkan dengan hasil penelitian Kino et al. (1997) yang melaporkan bahwa 9 dari 16 embrio (56,2%) yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar berhasil menetas, sedangkan hasil transfer PGC-sirkulasi yang dibekukan dan dimurnikan dengan menggunakan percol dan nycodenz menghasilkan 2 dari 26 embrio (7,7%) menetas dan 3 dari 26 embrio (11,5%) menetas.



Gambar 5. Embrio resipien ayam White Leghorn yang menetas setelah ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi segar ayam Gaok

Sementara itu, hasil penelitian Kuwana et al. (2006) yang mentransfer donor PGC-sirkulasi ayam KD mendapatkan 7 dari 13 embrio (53,8%) menetas. Sedangkan, perkembangan embrio resipien yang ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi beku hasil penelitian kurang memuaskan karena dengan jumlah donor PGC-sirkulasi yang sama, yaitu 100 sel hasil penelitian Naito et al. (1994) berhasil mendapatkan embrio resipien WL yang menetas sebanyak 15,6% (10/64) dan 33,3% (12/36) dengan embrio resipien BPR.

Persentase kematian embrio resipien WL yang diamati pada penelitian ini, baik yang ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi segar dan beku di mulai pada hari ke-7 yaitu masing-masing sebanyak 10% (3 ekor) dan 20% (3 ekor) (Tabel 1). Kemudian persentase kematian embrionya meningkat pada hari ke-10 sampai hari ke-20, bahkan untuk embrio resipien WL yang ditransfer dengan donor PGC-sirkulasi beku pada hari ke-20 persentase kematian embrionya mencapai 100% (15 ekor). Hasil yang sama dilaporkan oleh Fujiwara et al. (2009) bahwa kematian embrio resipien WL sebanyak 28,3% (17 ekor) mati di mesin inkubator kurang dari hari ke-4, kemudian meningkat menjadi 65% (39 ekor) setelah hari ke-4 sampai hari ke-19. Sementara itu, menurut Feng et al. (2006) periode kematian embrio di dalam inkubator dibagi menjadi 2 periode, yaitu periode *prophase* perkembangan embrio (hari ke-1 sampai 6) dan periode *anaphase* sampai menetas (setelah hari ke-18). Persentase kematian embrio lebih banyak pada periode kedua. Hal ini diduga lebih banyaknya embrio yang mati setelah hari ke-14 sampai dengan hari ke-20 ada kaitannya dengan embrio yang lebih rentan terhadap perubahan lingkungan eksternal, karena pada waktu ini embrio sedang menjalani perubahan lingkungan internal.

Germline Chimera ayam telah diproduksi dengan cara mentransfer donor PGC melalui peredaran darah dan telah diperoleh keturunannya (Naito et al. 1994, Furuta et al. 2001). Begitu juga dengan hibrida ayam *chimera* telah diproduksi dengan cara mentransfer donor PGC puyuh ke embrio ayam, ayam ke embrio kalkun, dan ayam ke embrio *pheasant* (Ono et al. 1998 a,b; Song et al. 2010).

Akan tetapi untuk mendapatkan *Germline Chimera* yang konsisten ada beberapa pendekatan yang perlu diperhatikan, seperti yang dikemukakan oleh Petite (2006) pendekatan yang perlu diperhatikan adalah harus ada sumber *germline* dan cara yang paling efisien untuk rekonstruksi *germline*. Pertama, sel harus diperoleh dari embrio, dapat diisolasi dari sel *blastodermal* segar, dari embrio stadium X atau PGC yang diperoleh dari stadium 14-16 selama embrio bermigrasi di sirkulasi darah atau stadium 26-28 ketika menetap di *germinal ridge*. Setelah sel diperoleh, *Germline Chimera* dapat dihasilkan melalui transfer sel pada stadium perkembangan yang sesuai. Telur dimanipulasi untuk menetas, dan kemudian diperoleh *chimera* yang dapat dikawinkan satu sama lain untuk program *progeny test*.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang sudah dilaksanakan dapat disimpulkan bahwa: jumlah PGC-sirkulasi yang ditransfer ke embrio resipien merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembentukan *Germline Chimera*. Masa kritis untuk perkembangan embrio yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi segar sebanyak 25, 50 dan 100 sel berturut-turut adalah pada hari ke-10, 14 dan 17, sedangkan yang ditransfer dengan PGC-sirkulasi beku masa kritis perkembangan embrio lebih singkat, yaitu hari ke-10 (perlakuan 25 dan 50 sel) dan hari ke-14 (perlakuan 100 sel). Dari transfer PGC-sirkulasi segar sebanyak 50 dan 100 sel ke embrio resipien berhasil menetas masing-masing sebanyak satu ekor (10%).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua staf kandang ayam Balitnak dan kesehatan hewan yang telah turut membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ayanwale A. 2006. The effect of supplementing *Saccharomyces cerevisiae* in the diets on egg laying and egg quality characteristics of pullets. J Int Poult Sci. 5:759-763.

Ensminger ME, Brant G, Colin GS. 2004. Poultry science. 4th ed. America (USA): Pearson Prentice Hall.

Feng YP, Gong YZ, Nabeel AA, Peng XL, Yuan JF, Zhao R. 2006. Analysis of the offspring sex ratio of chicken by using molecular sexing. Agricul Sci Chin. 5:545-549.

Fujiwara A, Ono T, Kagami H. 2009. Regeneration of muscular dystrophy chickens by transplantation of early blastodermal cells into recipient embryos. J Poult Sci. 46:46-51.

Furuta H, Marumiya S, Nakano I, Yoshida T, Mukouyama H, Tanaka M. 2007. Effect of transfer primordial germ cells (PGCs) into chick gonad. J Poult Sci. 44:335-338.

Furuta H, Kinoshita K, Maeda Y, Fujihara N. 2001. Restoration of genetic resources from Ehime native chicken via transferred primordial germ cells (PGCs). J Poult Sci. 38:302-307.

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 88:49-92.

Kim JN, Kim MA, Park TS, Kim DK, Park HJ, Ono T, Lim JM, Han JY. 2004. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. Mol Reprod Dev. 68:81-87.

Kim JN, Park TS, Park SH, Park KJ, Kim TM, Lee SK, Lim JM, Han JY. 2010. Migration and proliferation of intact and genetically modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken. Biol Reprod. 82:257-262.

Kino K, Pain B, Leibo SP, Cochran M, Clark ME, Etches RJ. 1997. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. Poult Sci. 76:753-760.

Kuwana T, Kawashima T, Naito M, Yamashita H, Matsuzaki M, Takano T. 2006. Conservation of a threatened indigenous fowl (Kureko Dori) using the germline chimeras transplanted from primordial germ cells. J Poult Sci. 43:60-66.

Kohara Y, Kanai Y, Tajima A. 2008. Cryopreservation of gonadal germ cells (GGCs) from the domestic chicken using vitrification. J Poult Sci. 45:57-61.

Mozdziak PE, Wysocki R, Angerman-Stewart J, Pardue SL, Petite JN. 2006. Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cell sorted gonocytes. Poult Sci. 85:1764-1768.

Mulyantini NGA. 2010. Ilmu manajemen ternak unggas. Yogyakarta (Indones): Gajah Mada University Press.

Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. Mol Reprod Dev. 39:153-161.

Nakamura Y, Usui F, Atsumi Y, Otomo A, Teshima A, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2009. Effects of busulfan sustained release emulsion on depletion and repopulation of primordial germ cells in early chicken embryos. J Poult Sci. 46:127-135.

- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult Sci.* 86:2182-2193.
- Ono T, Yokoi R, Maeda S, Nishida T, Aoyama H. 1998a. Settlement of quail primordial germ cells in chicken gonads. *Anim Sci Technol.* 69:546-555.
- Ono T, Yokoi R, Maeda S, Nishida T, Aoyama H. 1998b. Transfusion of chick primordial germ cells into quail embryos and their settlement in gonads. *Anim Sci Technol.* 69:911-915.
- Petite JN. 2006. Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells. *Poult Sci.* 85:237-242.
- Setioko AR, Tagami T, Tase H, Nakamura Y, Takeda K, Nirasawa K. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryos using commercial cryoprotectants. *J Poult Sci.* 44:73-77.
- Song G, Park TS, Kim TM, Han JY. 2010. Avian biotechnology: Insights from germ cell-mediated transgenic system. *J Poult Sci.* 47:197-207.
- Sukra Y. 2000. Wawasan ilmu pengetahuan embrio: Benih masa depan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta (Indonesia).
- Yang JH, Kim S. 2012. Establishment of an efficient and stable transgene expression system in chicken primordial germ cells. *Bull Korean Chem Soc.* 33:1536-1540.
- Yuwanta T. 2010. Telur dan kualitas telur. Yogyakarta (Indones): Gadjah Mada University Press.
- Zhao DF, Kuwana T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci.* 44:30-35.