

Metode Purifikasi dan Penyimpanan *Primordial Germ Cells*-Sirkulasi untuk Pelestarian Ayam Lokal

Tatan Kostaman

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002
tatankostaman@gmail.com

(Diterima 10 September 2014 – Direvisi 17 November 2014 – Disetujui 5 Desember 2014)

ABSTRAK

Primordial germ cells (PGCs) dapat dipergunakan untuk produksi ayam transgenik dan penyimpanan material genetik pada spesies unggas. *Primordial germ cells* merupakan sel-sel germinal yang terproliferasi, yang kemudian akan berubah bentuk menjadi spermatogonia di testis atau oogonia di ovarium. *Primordial germ cells* memiliki jalur migrasi yang unik, sehingga PGCs dapat dijaring dan dikoleksi dari darah embrio, kemudian diperbanyak serta dikembangkan dengan kultur. Makalah ini menguraikan tentang isolasi, koleksi, purifikasi, penyimpanan dan transfer PGCs-sirkulasi dari ayam-ayam lokal yang ada di Indonesia. Sejumlah PGCs-sirkulasi diisolasi dari ayam Gaok pada stadium 15 sebagai tingkat aman dengan krioprotectant DMSO dan setelah ditransfer ke embrio resipien menghasilkan anak-anak ayam. Dengan demikian, teknologi ini dapat dimanfaatkan untuk pelestarian plasma nutfah ayam lokal Indonesia.

Kata kunci: Ayam lokal, *primordial germ cells*, penyimpanan

ABSTRACT

Purification Method and Storage of Primordial Germ Cells-Circulation for Preservation of Local Chicken

Primordial germ cells (PGCs) can be used for producing transgenic chickens and preserving genetic material of avian species. Primordial germ cells are precursor of germline cells that could be made proliferation and differentiation to become spermatogonia in testes or oogonia in ovary. Primordial germ cells has a unique migration path, so that the PGCs can be isolated and collected from embryos and propagated and developed through the culture. This paper describes the isolation, collection, purification, storage and transfer of PGCs-circulation of local chickens in Indonesia. Some amount of PGCs-circulation were collected from Gaok chicken at stage 15 as the safe level using cryoprotectant DMSO and some chicks hatched after transferring the PGCs-circulation to recipient embryo. Thus, this technology would be useful for preservation of Indonesian local chicken.

Key words: Local chicken, primordial germ cells, cryopreservation

PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati berkaitan dengan keanekaragaman dalam spesies, antar spesies dan ekosistem. Keanekaragaman hayati merupakan berkah bagi seluruh umat manusia dan merupakan bagian integral dari perkembangan dunia. Menurut laporan *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* dari 10.064 spesies unggas 1.240 diantaranya diketahui dalam kondisi membahayakan menuju kepunahan (*IUCN* 2012). Faktor-faktor yang menyebabkan kepunahan, antara lain disebabkan oleh (1) Hilang atau rusaknya bagian vital dari habitatnya; (2) Angka kematian yang tinggi dan tingkat reproduksi yang rendah; (3) Tingkat eksplorasi yang tinggi, bahkan cenderung meningkat; dan (4) Perubahan iklim, geologi atau evolusi lingkungan yang relatif cepat.

Sartika & Iskandar (2007) melaporkan terdapat 43 rumpun ayam lokal Indonesia, dimana dari jumlah tersebut terdapat beberapa ayam lokal yang mempunyai

potensi untuk dikembangkan. Akan tetapi, beberapa ayam lokal tersebut populasinya sangat terbatas, sehingga perlu diperbanyak dan bahkan saat ini kemungkinan sudah sangat sulit untuk mendapatkan koleksi sebanyak itu, karena beberapa rumpun ayam tersebut hampir punah atau bahkan sudah punah. Beberapa jenis ayam lokal di Indonesia antara lain ayam Gaok merupakan ayam lokal khas daerah Madura dan Pulau Poteran, Kabupaten Sumenep, ayam Pelung yang terdapat di Cianjur, ayam Kokok Balengkek dari Sumatera Barat, ayam Ketawa atau Gaga dari Sulawesi Selatan, ayam Nunukan dari Kalimantan Utara, ayam Merawang dari Bangka Belitung dan sebagainya.

Pendekatan yang mulai dikembangkan pada saat ini yaitu melalui konservasi material genetik dengan menerapkan kemajuan teknologi reproduksi, seperti teknik kriopreservasi. Penyimpanan semen pada unggas sudah banyak dilakukan, akan tetapi hasilnya masih bervariasi, dimana fertilitas semen beku unggas lebih rendah daripada semen mamalia. Untuk

penyimpanan ovum dan embrio pada unggas sangat sulit atau bahkan mustahil dapat dilakukan, karena struktur dan ukuran yang besar pada kuning telur (Song & Silversides 2007).

Menjawab permasalahan di atas, pemanfaatan teknologi reproduksi yang sudah mulai dikembangkan sebagai metode alternatif untuk menyelamatkan material genetik ayam adalah dengan penyimpanan *primordial germ cells* (PGCs). Karena PGCs adalah materi yang sangat penting untuk produksi *germline chimera* ataupun produksi hewan transgenik. Perkembangan terakhir teknik manipulasi embrio dengan transfer PGCs ke embrio resipien memungkinkan mendapatkan keturunan yang sehat dari sel *germline* setelah dibekukan dan *di-thawing* melalui ayam *chimera* (Furuta et al. 2008; Park et al. 2008; Han 2009; Nakamura et al. 2011), dengan tingkat keberhasilan mencapai 99,5% (Nakamura et al. 2010).

Makalah ini menguraikan lebih mendalam tentang metode penyimpanan semen, serta purifikasi dan penyimpanan PGCs untuk pelestarian ayam lokal.

PENGUMPULAN DAN PENYIMPANAN SEMEN

Pengumpulan semen pada unggas bervariasi, hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan anatomi reproduksi. Ada tiga metode untuk koleksi semen pada unggas, yaitu (1) Pendekatan *co-operative*, sesuai dengan namanya teknik ini membutuhkan kerjasama dari donor yang dapat dicapai oleh stimulus eksternal yang berasal dari perilaku, misalnya suara, sarang, makanan. Hal-hal yang harus diperhatikan adalah donor tidak dalam keadaan stres dan cedera. Keuntungannya semen yang dikoleksi mempunyai kualitas baik dan tidak terkontaminasi, seperti oleh kotoran dan urin. Kelemahannya, jumlah semen yang diperoleh sedikit. Teknik pendekatan *co-operative* menunjukkan hasil yang menjanjikan dengan menggunakan vagina buatan (untuk entok) dan *dummy* (untuk puyuh dan burung unta) (Chełmońska et al. 2008) yang memerlukan perhatian khusus (Rybniček et al. 2007); (2) Elektro ejakulasi, biasanya digunakan untuk bebek, angsa dan merpati. Anastesis wajib dilakukan dan kontaminasi dengan air kencing merupakan kelemahan utama (Samour et al. 1985); (3) Teknik pijat perut, teknik ini diterima dan digunakan secara luas. Kelemahan dari teknik ini adalah apabila ada cedera pada daerah kloaka akan memberikan kontribusi semen yang terkontaminasi (Malecki et al. 2008).

Meskipun kriopreservasi semen pada unggas telah dipelajari secara ekstensif dalam 50 tahun terakhir, namun spermatozoa unggas umumnya lebih sensitif terhadap pembekuan dibandingkan dengan spermatozoa mamalia dan tingkat kesuburnya lebih rendah. Kesulitan dalam pembekuan semen unggas mungkin

berkaitan dengan bentuk morfologi spermatozoanya (Long 2006). Teknik penyimpanan semen, keunggulan, kelemahan sampai ke perkembangan penelitian kriopreservasi pada unggas sudah diulas secara mendalam oleh Kostaman & Setioko (2011).

PEMBENTUKAN PRIMORDIAL GERM CELLS

Primordial germ cells pertama kali terdeteksi pada embrio ayam oleh Swift tahun 1914 pada akhir proses gastrulasi (Ginsburg 1997). *Primordial germ cells* berasal dari luar gonad dan dengan mudah dapat diidentifikasi di daerah ekstra embrionik yang disebut dengan *germinal crescent*. *Primordial germ cells* ayam dapat diidentifikasi menggunakan (1) Kriteria morfologi, seperti memiliki ukuran sel yang besar (14-19 µm), nukleus yang sperikal dan besar serta terdapat lemak refraktif di sitoplasmanya, sehingga PGCs dapat dibedakan dengan sel lainnya; (2) Ditambah dengan penanda histokimia seperti *periodic acid-schiff* (PAS); (3) Pewarnaan glikogen, atau pewarnaan imunohistokimia antigen permukaan sel seperti *embryonic mouse antigen-1* (EMA-1) dan *stage-specific embryonic antigen-1* (SSEA-1); (4) Gen vasa homolog (Tsunekawa et al. 2000; Zhao & Kuwana 2003).

Primordial germ cells adalah sel germinal terdiferensiasi yang kemudian berdiferensiasi menjadi spermatogonia di testis atau oogonia di ovarium. *Primordial germ cells* dapat dikoleksi melalui darah embrio ayam pada umur 56 jam masa inkubasi atau stadium 14-16 (Hamburger & Hamilton 1951). Perkembangan terakhir tentang teknik manipulasi embrio dengan penggunaan transfer PGCs ke embrio resipien memungkinkan untuk mendapatkan keturunan yang sehat dari sel *germline* yang dibekukan dan *di-thawing* melalui ayam *germline chimera* (Furuta et al. 2001; 2008).

Pada spesies unggas terdapat dua cara untuk membedakan stadium perkembangan embrio, yaitu dari pembelahan pertama sampai pembentukan *primitive streak* menggunakan angka Romawi (Eyal-Giladi & Kochav 1976), sedangkan dari stadium *primitive streak* sampai menetas menggunakan angka Arab (Hamburger & Hamilton 1951). Berdasarkan pola migrasinya, PGCs ayam mengalami lima fase migrasi (Tabel 1) (Han 2009). Jalur migrasi yang unik tersebut membuat PGCs mudah untuk dimanipulasi dan dapat diisolasi dari tiga stadium yang berbeda, yaitu dari *blastoderm* atau stadium X, darah embrio setelah telur diinkubasi selama 2,5-3 hari (stadium 13 sampai 16) dikenal dengan PGCs-sirkulasi dan gonad embrio setelah telur diinkubasi selama 5,5-6 hari (stadium 26 sampai 28) dikenal dengan PGCs-gonad (Naito et al. 2007; 2009; Nakamura et al. 2009; Macdonald et al. 2010; Chojnacka-Puchta et al. 2012; Park & Han 2013).

Tabel 1. Pola migrasi *primordial germ cells* ayam

Stadium	Keterangan
Stadium X	Berada di daerah pusat area pelusida
Stadium 4	<i>Germinal crescent</i>
Stadium 10-17	Pindah dan beredar di pembuluh darah ekstra embrionik
Stadium 20-26	Migrasi dan berkoloniasi ke dalam gonad embrionik
Hatch	Perkembangbiakan atau perbedaan bagian organ kelamin

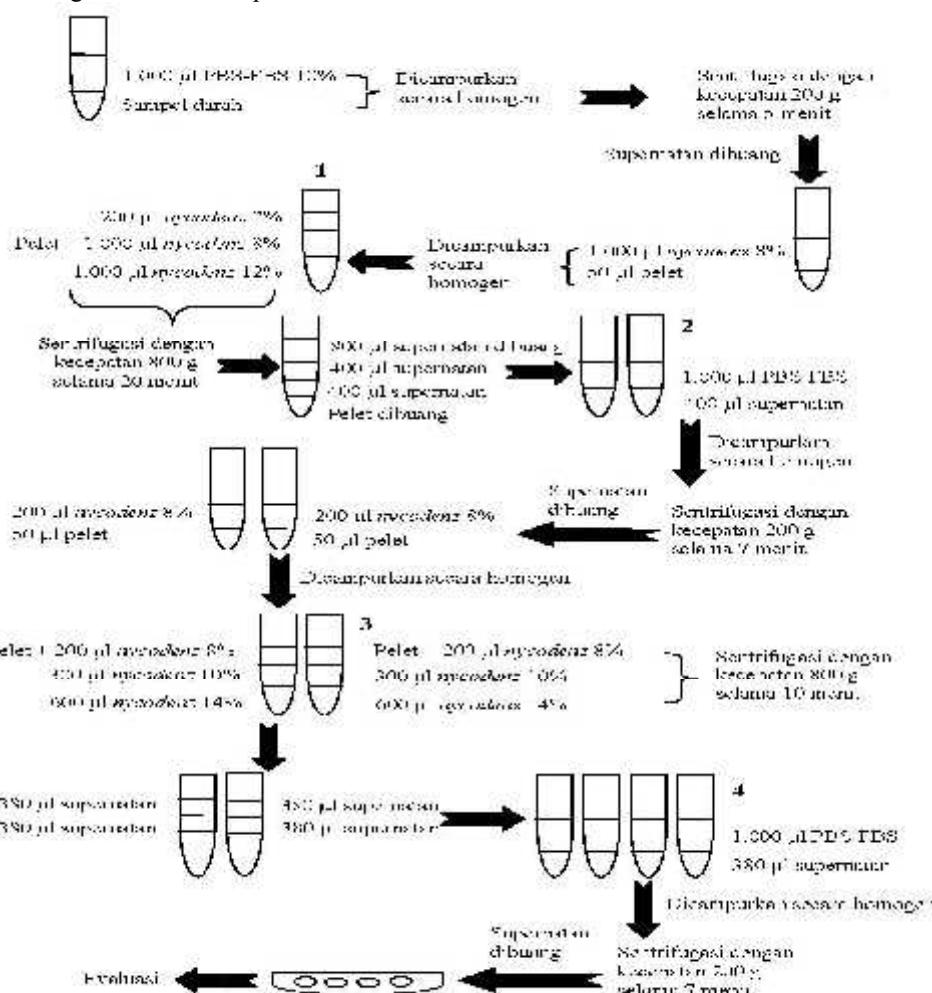
Sumber: Han (2009)

METODE PURIFIKASI PRIMORDIAL GERM CELLS-SIRKULASI

Metode purifikasi PGCs-sirkulasi yang digunakan Balai Penelitian Ternak (Balitnak) dimulai oleh Setioko (2008) dengan menggunakan *nycodenz*. Akan tetapi, dengan perkembangan metode purifikasi telah

mengalami modifikasi yang disesuaikan dengan kondisi lingkungan dan jumlah sampel darah embrio ayam lokal yang dikoleksi (Gambar 1). Faktor penyebabnya adalah jumlah PGCs-sirkulasi pada ayam lokal lebih sedikit dibandingkan dengan ayam ras. Sebagai contoh, jumlah PGCs-sirkulasi ayam *White Leghorn* lebih banyak 1,9 kali dibandingkan dengan jumlah PGCs-sirkulasi ayam Kureko Dori (Kuwana et al. 2006). Kemungkinan ada hubungannya dengan jumlah produksi telur dari masing-masing jenis ayam, yaitu ayam *White Leghorn* per tahun dapat memproduksi telur sebanyak ≥ 250 butir (Kuwana et al. 2006). Sementara itu, produksi telur ayam lokal seperti ayam Kedu Hitam hanya mampu memproduksi telur sekitar 160 butir per tahun (Nataamijaya 2008).

Metode purifikasi PGCs-sirkulasi terdiri dari dua kali purifikasi dan dua kali pembilasan. Purifikasi pertama, PGCs-sirkulasi masih bercampur dengan sel darah merah yang jumlahnya relatif banyak, sehingga sulit untuk mengisolasi dan mengoleksi PGCs-sirkulasi (Gambar 2A). Dari purifikasi kedua, jumlah

**Gambar 1.** Alur purifikasi PGCs ayam lokal di Balitnak

Sumber: Kostaman (2013)

sel darah merah semakin berkurang (Gambar 2B), dengan demikian PGCs-sirkulasi akan lebih mudah untuk diisolasi dan dikoleksi (Tabel 2). Untuk menghitung PGCs-sirkulasi menggunakan rumus dari Zhao & Kuwana (2003) sebagai berikut:

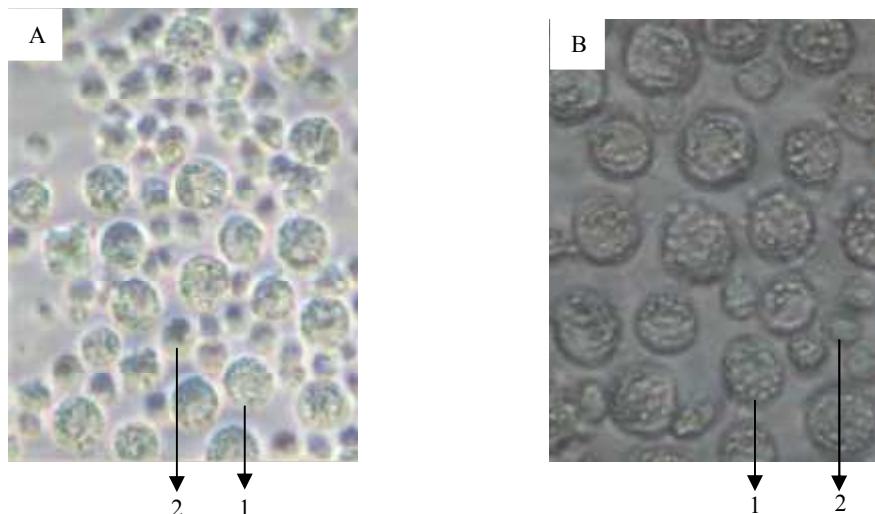
Jumlah PGCs-sirkulasi yang berhasil diisolasi

Jumlah embrio yang digunakan dalam setiap perlakuan

Primordial germ cells yang berada di sirkulasi darah dikenal dengan PGCs-sirkulasi, yang dapat dimurnikan dengan menggunakan *percoll*, *ficol*, filtrasi, *nycodenz* atau *ACK buffer* (Park et al. 2003; Tajima et al. 2003; Zhao & Kuwana 2003; Yamamoto et al. 2007). Hasil pemurniaan PGCs-sirkulasi dengan menggunakan *nycodenz* diperoleh koleksi PGCs-sirkulasi dengan tingkat kemurnian yang tinggi, yaitu bisa mencapai 90% untuk ayam dan 95% untuk tikus dengan viabilitas sel lebih dari 80%. Keuntungan lain dari penggunaan *nycodenz* untuk permurnian PGCs-sirkulasi dapat dilihat dari toksitasnya, dimana penggunaan media *nycodenz* secara nyata lebih rendah

dibandingkan dengan media gradien lainnya seperti *percoll* dan *ficol*, sehingga lebih mampu mempertahankan morfologi sel agar tetap normal (Mutzel & Speek 1980). Hal ini disebabkan *nycodenz* adalah bahan kimia *non-ionic*, mempunyai berat molekul sebesar 821 dan densitas sebesar 21 g/ml. Selain itu, dengan menggunakan *nycodenz* dapat memisahkan PGCs-sirkulasi tanpa perlu menambahkan agen antibodi ke permukaan sel membran PGCs (Mayanagi et al. 2003).

Nycodenz dalam bentuk serbuk memiliki sifat daya larut yang tinggi dalam air dan merupakan senyawa yang stabil ketika terkena panas, sehingga mudah dimanipulasi di laboratorium. *Nycodenz* juga mempunyai viskositas dan osmolalitas yang rendah dengan kepadatan yang tinggi, sehingga memungkinkan untuk memisahkan berbagai jenis sel (Rickwood et al. 1982; Mayanagi et al. 2003; Zhao & Kuwana 2003). Keuntungan lainnya, pemurnian dengan *nycodenz* adalah dapat dilakukan tanpa memerlukan peralatan yang mahal dan memiliki metode pemurnian yang mudah tanpa dibatasi oleh suhu dan pH.



A: Purifikasi pertama, PGCs-sirkulasi yang masih bercampur dengan sel darah merah; B: Purifikasi kedua, PGCs-sirkulasi yang diperoleh; 1: PGCs; 2: Sel darah merah

Gambar 2. Purifikasi PGCs-sirkulasi ayam lokal dengan metode gradien sentrifugasi menggunakan *nycodenz*

Sumber: Kostaman et al. (2013) yang dimodifikasi

Tabel 2. Jumlah PGCs-sirkulasi dari beberapa jenis unggas

Jenis ayam	Stadium	Jumlah PGCs-sirkulasi per embrio (sel)	Sumber
<i>Rhode Island Red</i>	15	67-73	Nakamura et al. (2007)
<i>Silky</i>	14	65	Qian et al. (2010)
<i>Gaok</i>	15	51	Kostaman et al. (2013)

PENYIMPANAN *PRIMORDIAL GERM CELLS*-SIRKULASI

Kriopreservasi digunakan untuk penyimpanan sel dalam jangka panjang dengan mempertahankan sistem seluler pada suhu sangat rendah yaitu -196°C (Spindler et al. 2012). Suhu yang sangat rendah ini penting untuk menghentikan metabolisme dari sel dan jaringan. Kriopreservasi memberikan keuntungan untuk memaksimalkan penggunaan dan ketersediaan bahan biologis yang memiliki jumlah terbatas.

Primordial germ cells-sirkulasi ayam dapat disimpan dalam nitrogen cair dengan menggunakan metode yang sederhana, tanpa menghilangkan kemampuannya untuk dapat diaktifkan kembali ke perkembangan lebih lanjut melalui *germline chimera* (Kuwana et al. 2006; Yamaha et al. 2007; Nakamura et al. 2010), sehingga memberikan metode alternatif untuk penyimpanan jangka panjang dari materi genetik jantan dan betina. Lebih jauh, dengan kriopreservasi PGCs-sirkulasi sebagai material genetik sangat efektif untuk strategi konservasi, seperti yang dikembangkan oleh Glover & McGrew (2012) bahwa PGCs-sirkulasi dapat dikoleksi dari darah embrio dan diperbanyak serta dikembangkan dengan kultur sebelum kriopreservasi. Alternatif lain, PGCs-sirkulasi dapat dimurnikan dari darah embrio yang dikumpulkan sebelum kriopreservasi. Selanjutnya, PGCs-sirkulasi dapat dibekukan dan ditransfer ke dalam embrio resipien.

Fenomena utama selama proses kriopreservasi yang dapat menurunkan viabilitas sel adalah kejutan dingin (*cold shock*) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang berkaitan dengan pembentukan kristal es. Selain itu, yang perlu dipahami pada proses kriopreservasi adalah memahami prinsip terpenting dari kriopreservasi, yaitu pengeluaran air dari dalam sel (*dehidrasi*) sebelum terjadi pembekuan intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi, akan terbentuk kristal es yang besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat, maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Secara khusus, selama proses pembekuan dan *thawing*, respon osmotik sel adalah faktor yang akan mempengaruhi hasil viabilitas sel. Respon osmotik dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah penambahan krioprotektan (Watson 2000).

Krioprotektan adalah zat kimia non-elektrolit yang berfungsi mereduksi pengaruh letal proses pemaparan kriopreservasi sel, diantaranya baik yang berupa efek larutan maupun pembentukan kristal es ekstra atau intraseluler sehingga dapat menjaga viabilitas sel setelah kriopreservasi. Ini menunjukkan, bahwa krioprotektan mempunyai peranan sangat penting dan menentukan keberhasilan kriopreservasi sel, yaitu sebagai medium pelindung sel dalam proses

kriopreservasi sel. Selain itu, harus diperhatikan bahwa pemilihan krioprotektan dengan kapasitas penetrasi maksimum tetapi toksisitas minimum dan potensi membentuk kristal es bersifat spesifik pada setiap tipe sel dan jaringan (Paynter & Fuller 2004).

Tujuan penambahan krioprotektan adalah untuk melindungi sel dari efek yang mematikan selama proses pembekuan dengan memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan menjadi lebih kecil, sehingga mampu menghambat kerusakan membran sel secara mekanis pada waktu penurunan suhu (Tambing et al. 2000). Secara umum, krioprotektan harus dapat segera (1) Menembus sel (krioprotektan intraselular) dan mengganti molekul air dalam sel; (2) Menurunkan titik beku atau melindungi membran sel (krioprotektan ekstraselular); (3) Mengikat bagian depan kelompok fosfolipid; (4) Meningkatkan viskositas medium kriopreservasi; atau (5) Menurunkan konsentrasi elektrolit selama pembekuan (Santos 2007).

Berdasarkan cara kerjanya, krioprotektan dikelompokkan menjadi *penetrating* (bekerja di dalam dan di luar sel) seperti *dimethyl sulfoxide* (DMSO), EG, gliserol, 1,2-propanediol, metanol dan *N,N-dimethylacetamid* dan *non-penetrating* (hanya di luar sel) seperti glukosa dan sukrosa (Pedro et al. 2005; Edashige & Kasai 2007). Sementara itu, berdasarkan bahan yang terkandung di dalamnya, krioprotektan diklasifikasikan menjadi dua golongan yaitu golongan alkohol (seperti EG dan gliserol) dan golongan amida (seperti dimetil formamida, asetamida dan metil formamida) (Alvarenga et al. 2005).

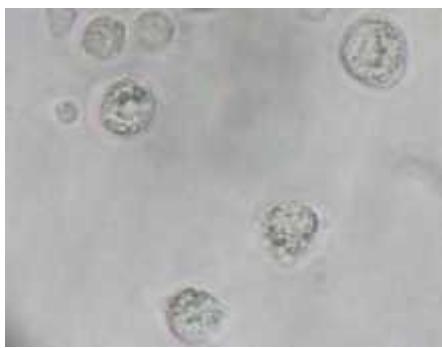
Jenis krioprotektan yang baik dan sudah sangat lazim digunakan dalam proses kriopreservasi PGCs-sirkulasi unggas adalah DMSO (Kuwana et al. 2006; Setioko et al. 2007; Nakamura et al. 2011). *Dimethyl sulfoxide* sering digunakan dalam biologi sebagai agen krioprotektan, karena mempunyai fungsi antara lain sebagai pelarut antioksidan, meningkatkan permeabilitas membran sel dan dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium pada sitoplasma (Santos 2007).

Dimethyl sulfoxide adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ dan mempunyai berat molekul sebesar 78,2. *Dimethyl sulfoxide* juga dikenal sebagai krioprotektan konvensional yang ditambahkan ke media sel untuk mencegah kematian sel sepanjang proses pembekuan. Titik beku DMSO tinggi, pada suhu kamar merupakan suatu padatan yang dapat membatasi kegunaannya dalam beberapa proses kimia (seperti kristalisasi pada waktu *cooling*). Penambahannya tidak lebih dari 10% pada metode *slow-freezing* dan sel aman dibekukan pada -80°C atau yang disimpan dalam nitrogen cair (Randhawa 2006).

Keberhasilan suatu metode dalam penyimpanan dapat ditentukan melalui evaluasi mikroskopis dari morfologi PGCs-sirkulasi. Berdasarkan karakteristik

morfologi dapat diketahui persentase *recovery rate* dan viabilitas, PGCs-sirkulasi hasil pembekuan hampir sama dengan yang sebelum dibekukan, yaitu selnya masih utuh, berbentuk bulat besar dan pinggirnya tampak seperti suatu cincin cerah di bawah membran sel. Sementara itu, untuk PGCs-sirkulasi yang mati bentuk sel tidak beraturan (Gambar 3).

Persentase *recovery rate* dan viabilitas PGCs-sirkulasi setelah disimpan dan di-*thawing* dari beberapa sumber disajikan pada Tabel 3. Perbedaan persentase *recovery rate* dan viabilitas PGCs-sirkulasi dipengaruhi oleh faktor metode penyimpanan dan jenis kemasan yang digunakan pada waktu penyimpanan. Kostaman (2013) melakukan penyimpanan PGCs-sirkulasi menggunakan metode pembekuan lambat dengan pengaturan kecepatan pendinginan menggunakan mesin ET-1 dan dikemas ke dalam *straw*, sedangkan peneliti lain dengan metode pembekuan menggunakan *nalgen* dan dikemas ke dalam *cryovial*. Faktor kemasan akan berpengaruh terhadap kecepatan penurunan suhu dan kecepatan pencairan kembali sel (Mohamad et al. 2005).



PGCs-sirkulasi setelah dibekukan dan di-*thawing*

Gambar 3. Morfologi PGCs setelah kriopreservasi

Tabel 3. Rata-rata persentase *recovery rate* dan viabilitas PGCs-sirkulasi dari berbagai sumber

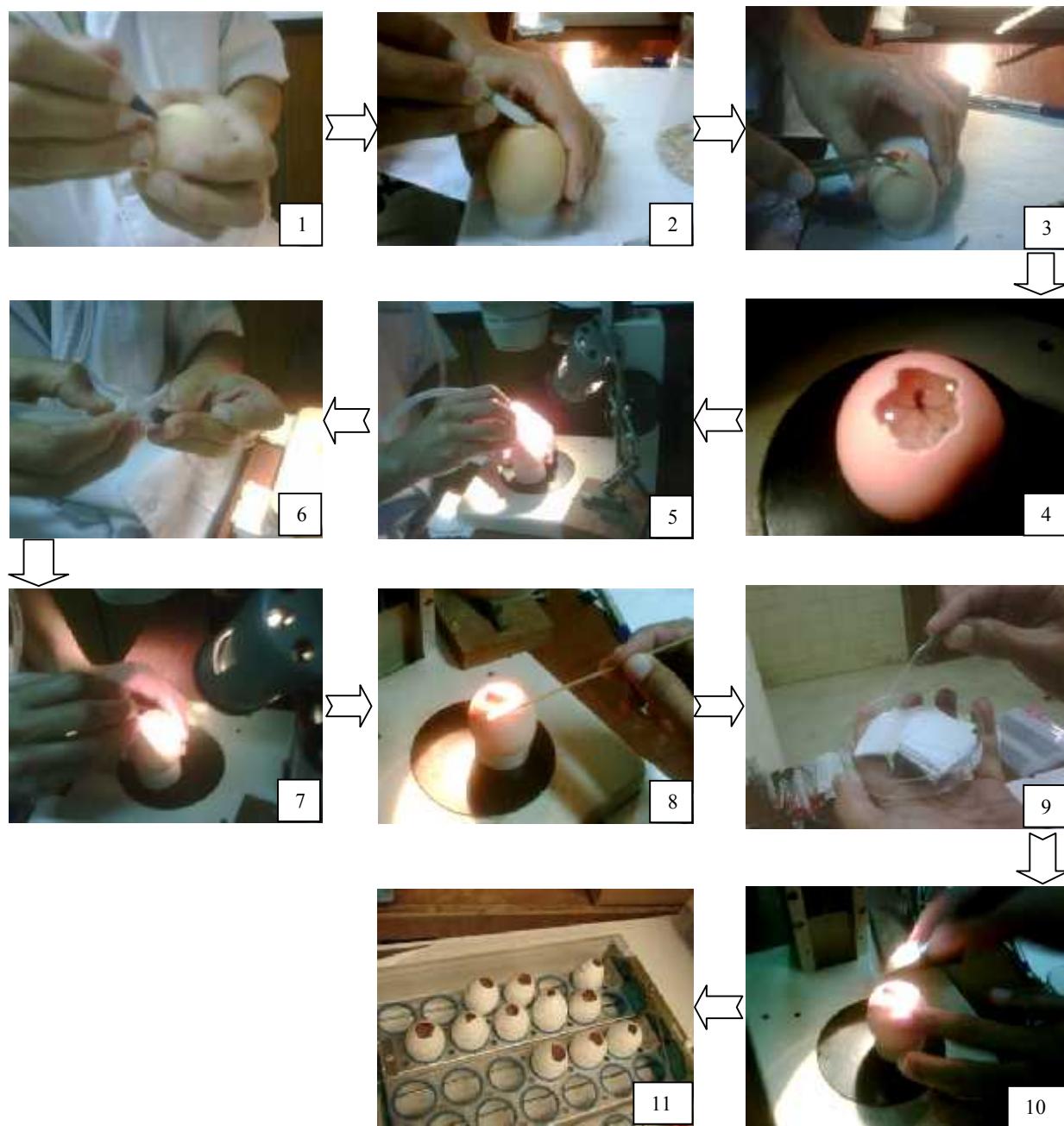
Jenis Ayam	Konsentrasi DMSO (%)	Recovery rate (%)	Viabilitas (%)	Sumber
<i>White Leghorn</i>	10	-	76,5	Moore et al. (2006)
<i>White Leghorn</i>	10	49,9	83,5	Setioko et al. (2007)
<i>Barred Plymouth Rocks</i>	10	54,3	86,8	Nakamura et al. (2011)
Gaok	5	48,2	79,2	Kostaman (2013)

Konservasi dalam bentuk PGCs-sirkulasi segar dan beku harus dapat dikembangkan kembali menjadi individu unggas baru hasil konservasi. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mentransfer kembali PGCs-sirkulasi ke embrio resipien untuk mendapatkan ayam *germline chimera* (Gambar 4).

Pembentukan ayam *germline chimera* mempunyai arti penting untuk penelitian fisiologi, tingkah laku dan biologi perkembangan. *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 (Ishiguro et al. 2008; Kang et al. 2008; Furuta 2012). *Germline chimera* mempunyai aplikasi praktis di dalam konservasi spesies dan stok genetik yang ada, karena dapat memelihara material genetik dengan cara menyimpan PGCs yang dibekukan dibandingkan dengan memelihara hewan hidup (Mozdziak et al. 2006).

Teknik untuk mendapatkan *germline chimera* pada ayam ras dengan transfer PGCs donor ke embrio resipien telah berhasil dilakukan dan telah diperoleh keturunannya (Park et al. 2003; Furuta et al. 2008), pada burung puyuh (Kim et al. 2005; Park et al. 2008) dan juga pada burung kuau (Kang et al. 2009). Begitu juga dengan hibrida ayam *chimera* telah berhasil didapatkan dengan cara transfer donor PGCs puyuh ke embrio ayam, donor PGCs ayam ke embrio kalkun dan donor PGCs ayam ke embrio *pheasant* (Ono et al. 1998a; 1998b; Song et al. 2010).

Kostaman et al. (2014) telah berhasil mentransfer PGCs-sirkulasi ayam lokal ke embrio resipien, walaupun yang menetas belum banyak (Gambar 5). Akan tetapi, ini membuktikan bahwa teknologi ini dapat dilakukan dan bermanfaat untuk pelestarian ayam lokal di Indonesia.



1: Pada telur resipien (WL), kerabang telur yang tumpul dibuat lubang kecil; 2: Telur dibalik, sehingga bagian kerabang yang tumpul ada di bawah dan bagian kerabang yang runcing ada di atas; 3-4: Bagian kerabang yang runcing kemudian dibuat lubang (diameter 1,5-2 cm) hingga embrio terlihat; 5: Menggunakan mikropipet (30 μm) di bawah mikroskop (Olympus SZ30, Jepang) seluruh darah embrio resipien diambil dari bagian *aorta dorsalis*; 6: Melalui spot yang sama, ditransfer donor PGCs-sirkulasi (yang sudah disiapkan) ke embrio resipien; 7-10: Lubang telur resipien ditutup dengan *cling film*; 11: Telur embrio resipien diinkubasi pada suhu 38°C dan kelembaban 60% menggunakan inkubator portable (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Jepang) selama 21 hari

Gambar 4. Proses tahapan pembentukan *germline chimera*

Sumber: Kostaman (2013)



Gambar 5. Embrio resipien (ayam WL) yang berkembang dan berhasil menetas setelah ditransfer dengan PGCs-sirkulasi ayam lokal

Sumber: Kostaman et al. (2014)

Menurut Petitte (2006) untuk mendapatkan *germline chimera* yang konsisten, ada beberapa pendekatan yang perlu diperhatikan, yaitu sel harus diperoleh dari embrio, dapat diisolasi dari sel *blastoderm* segar, dari embrio stadium X atau PGCs 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*. *Progeny test* telah berhasil diperoleh dari *germline chimera* setelah mentransfer sekitar 500 sel *blastoderm* beku dan dicairkan kembali ke embrio stadium X (Kino et al. 1997). Bednarczyk & Czekalski (2006) menyatakan bahwa embrio ayam yang ditransfer dengan sel jantan memiliki kinerja reproduksi signifikan lebih tinggi daripada ayam yang ditransfer dengan sel betina.

KESIMPULAN

Konservasi material genetik sudah waktunya dikembangkan di Indonesia. Pada unggas, semen beku dapat digunakan untuk sperma saja, tetapi hasil yang lebih baik adalah dengan PGCs. PGCs-sirkulasi merupakan salah satu material genetik yang dapat disimpan untuk jangka panjang dari materi genetik jantan dan betina, yang suatu saat dapat diaktifkan kembali untuk meneruskan perkembangan lebih lanjut melalui *germline chimera*. Balitnak sudah memulai dan berhasil mendapatkan anak-anak ayam lokal yang menetas dengan cara transfer PGCs-sirkulasi ayam lokal ke embrio resipien.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci.* 89:105-113.
- Bednarczyk M, Czekalski P. 2006. Influence of chimerism on selected cock reproductive traits. *Med Weter.* 62:85-88.
- Chełmońska B, Jerysz A, Łukaszewicz E, Kowalczyk A, Malecki I. 2008. Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. *Turkish J Vet Anim Sci.* 32:19-24.
- Chojnicka-Puchta L, Kasprzyk K, Plucienniczak G, Sawicka D, Bednarczyk M. 2012. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Pol J Vet Sci.* 15:181-188.
- Edashige K, Kasai M. 2007. The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos and its relevance to cryopreservation. *J Mamm Ovarium Res.* 24:18-22.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev Biol.* 49:321-337.
- Furuta H, Kinoshita K, Maeda Y, Fujihara N. 2001. Restoration of genetic resources from chime native chicken via transferred primordial germ cells (PGCs). *J Poult Sci.* 38:302-307.
- Furuta H, Sawada T, Nishikawa K, Yamamoto I, Yoshida T, Tanaka M. 2008. Transfer of blood containing primordial germ cells between chicken eggs development of embryonic reproductive tract. *Cytotechnology.* 56:27-32.
- Furuta H. 2012. Establishing germline chimeric chickens using primordial germ cells. *J Poult Sci.* 49:1-4.
- Ginsburg M. 1997. Primordial germ cell development in avians. *Poult Sci.* 76:91-95.
- Glover JD, McGrew MJ. 2012. Primordial germ cell technologies for avian germplasm cryopreservation and investigating germ cell development. *J Poult Sci.* 49:155-162.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 88:49-92.
- Han JY. 2009. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 32:61-80.
- Ishiguro S, Kanai Y, Tajima A. 2008. Production of inter-genus somatic nuclear transferred gonadal germ cells (snt-GGCs) in avian species. *J Poult Sci.* 45:143-148.
- IUCN. 2012. Summary statistics. The IUCN Red list of threatened speciesTM. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

- [Internet]. [cited 2014 August 18]. Available from: <http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics>
- Kang SJ, Choi JW, Kim SY, Park KJ, Kim TM, Lee YM, Kim H, Lim JM, Han JY. 2008. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. *Biol Reprod.* 79:931-937.
- Kang SJ, Choi JW, Park KJ, Lee YM, Kim TM, Sohn SH, Lim JM, Han JY. 2009. Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: Effect of donor cell sex on chimeric semen production. *Theriogenology.* 72:519-527.
- Kim MA, Park TS, Kim JN, Park HJ, Lee YM, Ono T, Lim JM, Han JY. 2005. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras by transfer of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Theriogenology.* 63:774-782.
- 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.
- Kostaman T, Setioko AR. 2011. Perkembangan penelitian teknik kriopreservasi untuk penyimpanan semen unggas. *Wartazoa.* 21:145-152.
- Kostaman T, Yusuf TL, Fahrurfin M, Setiadi MA, Setioko AR. 2014. Pembentukan *germline chimera* ayam Gaok menggunakan *primordial germ cells* sirkulasi segar dan beku. *JITV.* 19:17-25.
- Kostaman T, Yusuf TL, Fahrurfin M, Setiadi MA. 2013. Isolasi dan jumlah *primordial germ cells* (PGCs) sirkulasi pada stadium perkembangan embrio ayam Gaok. *JITV.* 18:27-33.
- Kostaman T. 2013. Isolasi dan kriopreservasi *primordial germ cells* (PGCs) menggunakan krioprotektan DMSO untuk pembentukan *germline chimera* ayam Gaok [Disertasi]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Long JA. 2006. Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges? *Poult Sci.* 85:232-236.
- Macdonald J, Glover JD, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ. 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One.* 5.
- Malecki IA, Rybnik PK, Martin GB. 2008. Artificial insemination technology for ratites: A review. *Aust J Exp Agric.* 48:1284-1292.
- Mayanagi T, Kurosawa R, Ohnuma K, Ueyama A, Ito K, Takahashi J. 2003. Purification of mouse primordial germ cells by nycodenz. *Reproduction.* 125:667-675.
- Mohamad K, Djuwita I, Boediono A, Supriatna I. 2005. Vitrifikasi ovarium mencit menggunakan etilen glikol dan DMSO sebagai krioprotektan dan viabilitasnya pasca-autotransplantasi di subkapsula ginjal. *Media Kedokteran Hewan.* 21:23-27.
- Moore DT, Purdy PH, Blackburn HD. 2006. A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poult Sci.* 85:1784-1790.
- Mozdziak PE, Wysocki R, Angerman-Stewart J, Pardue SL, Petitte JN. 2006. Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cell-sorted gonocytes. *Poult Sci.* 85:1764-1768.
- Mutzel W, Speek V. 1980. Pharmacokinetics and biotransformation of iohexol in the rat and the dog. *Acta Radiol Suppl.* 362:87-92.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T. 2007. Intense expression of GFP gene in gonads of chicken embryos by transfecting circulating primordial germ cells *in vitro* and *in vivo*. *J Poult Sci.* 44:416-425.
- Naito M, Minematsu T, Harumi T, Kuwana T. 2009. Preferential migration of transferred primordial germ cells to left germinal ridge of recipient embryos in chickens. *J Poult Sci.* 46:40-45.
- 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, Usui F, Miyahara D, Mori T, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2010. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reprod Fertil Dev.* 22:1237-1246.
- Nakamura Y, Usui F, Miyahara D, Mori T, Watanabe H, Ono T, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. 2011. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chicken. *J Poult Sci.* 48:57-63.
- 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.
- Nataamijaya AG. 2008. Karakteristik dan produktivitas ayam Kedu Hitam. *Buletin Plasma Nutfah.* 14:85-89.
- Ono T, Yokoi R, Maeda S, Nishida T, Aoyama H. 1998a. Transfusion of chick primordial germ cells into quail embryos and their settlement in gonads. *Anim Sci Technol.* 69:911-915.
- Ono T, Yokoi R, Maeda S, Nishida T, Aoyama H. 1998b. Settlement of quail primordial germ cells in chicken gonads. *Anim Sci Technol.* 69:546-555.
- Park TS, Han JY. 2013. Conservation of migration and differentiation circuits in primordial germ cells between avian species. *J Reprod Dev.* 59:252-257.

- Park TS, Jeong DK, Kim JN, Song GH, Hong YH, Lim JM, Han JY. 2003. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol Reprod.* 68:1657-1662.
- Park TS, Kim M, Lim JM, Han JY. 2008. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras derived from *in vitro*-cultured gonadal primordial germ cells. *Mol Reprod Dev.* 75:274-281.
- Paynter SJ, Fuller BJ. 2004. Cryopreservation of the female reproductive cells: current concepts and controversies 2PN. *Attual Sci Biol Reprod.* 1:1-27.
- Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Oshida NY, Valdez D, Tanakan JM, Edashige, Kasai M. 2005. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev.* 51:235-246.
- Petitte JN. 2006. Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poult Sci.* 85:237-242.
- Qian C, Zhao Z, Han H, Zhao C, Jin X, Zhao H, Zhang Y, Chen W, Yang N, Li Z. 2010. Influence of microgravity on the concentration of circulating primordial germ cells in Silky chicken offspring. *J Poult Sci.* 47:65-70.
- Randhawa MA. 2006. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Japanese J Med Mycol.* 47:313-318.
- Rickwood D, Ford T, Graham J. 1982. Nycoedenz: A new nonionic iodinated gradient medium. *Anal Biochem.* 123:23-31.
- Rybniček PK, Horbanczuk JO, Naranowicz H, Lukaszewicz E, Malecki IA. 2007. Semen collection in the ostrich (*Struthio camelus*) using a dummy or a teaser female. *Br Poult Sci.* 48:635-643.
- Samour HJ, Spratt DMJ, Hutton RE, Jones DM. 1985. Studies on semen collection in waterfowl by electrical stimulation. *Br Vet J.* 141:265-268.
- Santos RR. 2007. Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto transplantation [Thesis]. [Utrecht (Netherlands)]. Utrecht University.
- Sartika T, Iskandar S. 2007. Mengenal plasma nutfah ayam Indonesia dan pemanfaatannya. Bogor (Indonesia): Balai Penelitian Ternak.
- Setioko AR, Tagami T, Tase H, Nakamura Y, Takeda K, Nirasawa K. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryo using different cryoprotectant. *J Poult Sci.* 44:73-77.
- Setioko AR. 2008. Konservasi plasma nutfah unggas melalui kriopreservasi *primordial germ cells* (PGCs). *Wartazoa.* 18:68-77.
- Song G, Park TS, Kim TM, Han JY. 2010. Avian biotechnology: Insights from germ cell-mediated transgenic systems. *J Poult Sci.* 47:197-207.
- Song Y, Silversides FG. 2007. Production of offspring from cryopreserved chicken testicular tissue. *Poult Sci.* 86:1390-1396.
- Spindler R, Rosenhahn B, Hofmann N, Glasmacher B. 2012. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology.* 64:250-260.
- Tajima A, Barbato GF, Kuwana T, Hammerstedt RH. 2003. Conservation of a genetically selected broiler line (42L) using cryopreserved circulating primordial germ cells (PGCs) isolated by filtration method. *J Poult Sci.* 40:53-61.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Sutama IK. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *JITV.* 5:1-8.
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T. 2000. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development.* 127:2741-2750.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61:481-492.
- Yamaha E, Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K. 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *J Sea Res.* 58:8-22.
- Yamamoto Y, Usui F, Nakamura Y, Ito Y, Tagami T, Nirasawa K, Matsubara Y, Ono T, Kagami H. 2007. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol Reprod.* 77:115-119.
- Zhao DF, Kuwana T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycoedenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci.* 44:30-35.