

Perkembangan dan Konservasi *Gonadal Primordial Germ Cell* untuk Pelestarian Ayam Lokal di Indonesia

(Development and Conservation of *Gonadal Primordial Germ Cells* for Preservation of Local Chicken in Indonesia)

Tatan Kostaman dan S Sopiya

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

(Diterima 12 Februari 2016 – Direvisi 19 Agustus 2016 – Disetujui 5 September 2016)

ABSTRACT

One of the *ex situ* conservation techniques for poultry that recently developed was to collect primordial germ cell (PGC) or gonadal primordial germ cell (gPGC) that isolated from embryo development. Primordial germ cells (PGC) are embryonic cells that migrate to the gonads and form the precursors of gametes. The unique nature and accessibility of PGC during the early development provides an opportunity to manipulate the poultry germplasm, for example by forming germline chimeras. There are some stages that must be done through isolation and collection of PGC from its resources i.e. blastoderm, embryonic circulation blood and gonad. PGC collection originating from the gonads is one of existing PGC resources and technologies. gonadal PGC have advantages compared with other sources, namely (1) A large number of gonadal PGC can be taken from an embryo; and (2) A collection of gonadal PGC can be used in developing management systems of local avian germplasm conservation. This review is intended to describe the usefulness of isolation and collection technology of gonadal PGC as the local poultry germplasm conservation in Indonesia.

Key words: Collection, *gonadal primordial germ cell*, native chicken

ABSTRAK

Salah satu cara konservasi *ex situ* beku pada unggas yang berkembang akhir-akhir ini adalah dengan mengumpulkan *primordial germ cell* (PGC) atau *gonadal primordial germ cell* (gPGC) yang diisolasi dari perkembangan awal embrio. *Primordial germ cell* merupakan sel-sel embrio yang bermigrasi ke prekursor gonad dan membentuk gamet. Sifat unik dan aksebilitas PGC selama perkembangan awal memberikan kesempatan untuk memanipulasi plasma nutfah unggas, misalnya dengan membentuk *germline chimera*. Tahapan-tahapan yang harus dilakukan adalah dengan melakukan isolasi dan koleksi dari tiga sumber utama yaitu blastoderm, sirkulasi darah embrio dan gonad embrio. Koleksi PGC yang berasal dari gonad merupakan salah satu pilihan dari teknologi koleksi PGC yang ada. *Primordial germ cell* gonad mempunyai kelebihan dibandingkan dengan PGC dari sumber lain, yaitu (1) Sejumlah besar dari gonadal PGC dapat diambil dari satu embrio; dan (2) Koleksi gonadal PGC dapat digunakan dalam membangun sistem manajemen pelestarian plasma nutfah unggas lokal. Makalah ini mengulas kegunaan teknologi isolasi dan koleksi gonadal PGC sebagai bagian dari sistem pelestarian plasma nutfah unggas lokal di Indonesia.

Kata kunci: Koleksi, *gonadal primordial germ cell*, ayam lokal

PENDAHULUAN

Untuk mempertahankan pelestarian plasma nutfah, kegiatan konservasi dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *in situ* di habitat asalnya, *ex situ* hewan hidup di luar habitatnya dan kriopreservasi sumber daya genetik (*ex situ* beku). Salah satu cara konservasi *ex situ* beku pada unggas yang berkembang akhir-akhir ini adalah dengan mengumpulkan dan mentransfer *primordial germ cell* (PGC) atau *gonadal primordial germ cell* (gPGC) yang diisolasi dari perkembangan awal embrio (Han et al. 2002). Perkembangan awal *germ cells* telah dipelajari

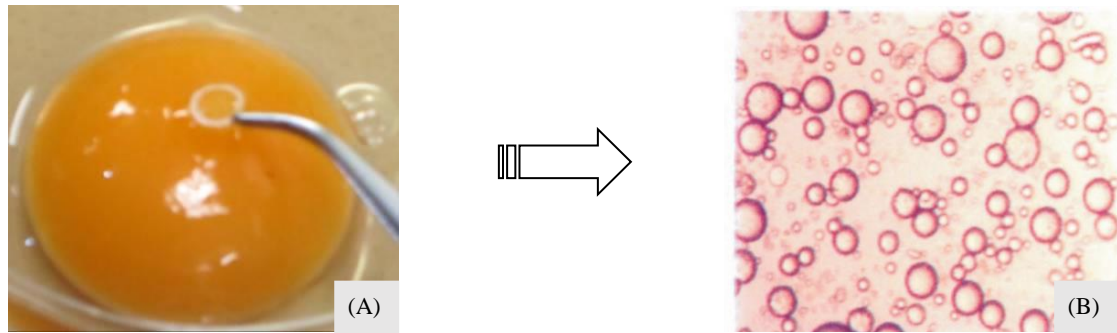
pada unggas, seperti pada ayam dan burung puyuh. *Primordial germ cell* dapat diidentifikasi dengan ukurannya yang besar, inti yang sperikal dan besar, serta butiran lemak terang dalam sitoplasma (Nakamura et al. 2013).

Primordial germ cell adalah prekursor sel telur dan spermatozoa matang pada unggas dewasa dan penghubung genetik antar generasi (D'Costa et al. 2001). Tsunekawa et al. (2000) melaporkan bahwa PGC merupakan gen *vasa homolog* yang diisolasi pada ayam dan menunjukkan ekspresi *germline* khusus dalam perkembangannya. Pada ayam, gen *vasa* adalah satu dari beberapa penanda khusus *germline* dan banyak

penelitian PGC ayam berfokus pada gen *vasa* tersebut. Selain *vasa*, gen *homolog* ayam adalah *dead end* (Aramaki et al. 2007; 2009), yang merupakan kode *RNA-binding proteins*, yang dapat digunakan sebagai penanda khusus *germline*. *Vasa* dan *dead end* diekspresikan pada kedua sel *germline* jantan dan betina (Kito et al. 2010).

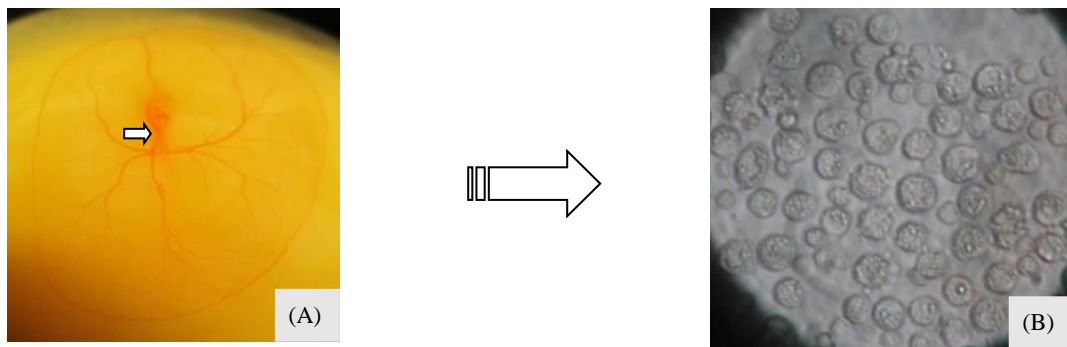
Primordial germ cell pada unggas memiliki potensi yang signifikan untuk digunakan dalam studi

berbasis sel dan pelestarian plasma nuftah unggas, karena PGC dapat dikoleksi dari *blastoderm*, darah embrio dan gonad embrio (Chojnacka-Puchta et al. 2012) (Gambar 1, 2 dan 3). Meskipun tidak ada perubahan fenotipik di antara berbagai sumber PGC yang diamati dan pola ekspresi penanda tertentu, namun keuntungan dari PGC gonad dibandingkan dengan sumber lain adalah sejumlah besar PGC dapat diambil hanya dari satu embrio (Park & Han 2012).



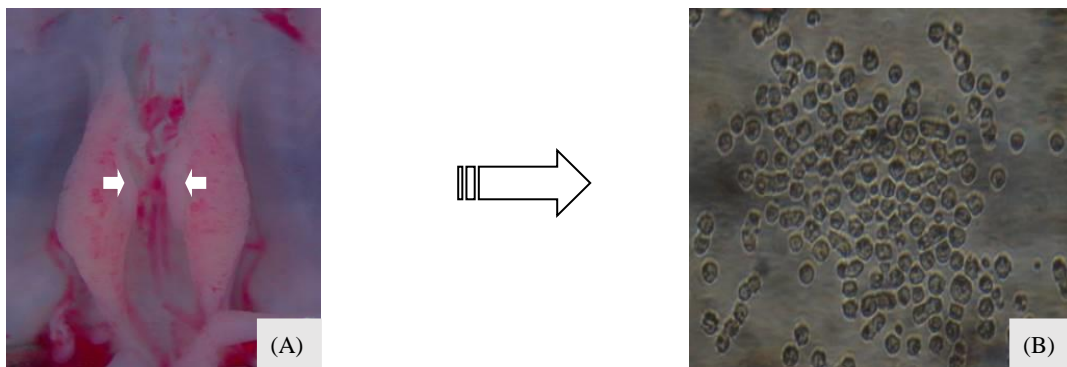
Gambar 1. (A) Daerah sel *blastoderm* yang berbentuk cincin dari telur fertil yang tidak diinkubasi; (B) *Primordial germ cell* yang telah dimurnikan yang berasal dari sel *blastoderm*

Sumber: A: Koleksi pribadi; B: Chojnacka-Puchta et al. (2012)



Gambar 2. (A) Daerah *aorta dorsalis* (anak panah) untuk pengambilan sampel darah dari telur yang diinkubasi selama tiga hari; (B) *Primordial germ cell* yang telah dimurnikan yang berasal dari sirkulasi darah embrio

Sumber: Koleksi pribadi



Gambar 3. (A) Gonad yang diambil dari telur yang diinkubasi selama tujuh hari (anak panah); (B) *Primordial germ cell* yang telah dimurnikan yang berasal dari gonad embrio

Sumber: Koleksi pribadi

Sifat unik dari PGC unggas selama perkembangan awal memberikan kesempatan untuk memanipulasi plasma nutfah unggas. Dua penggunaan PGC yang sering dilaporkan, yaitu sel-sel ini dapat digunakan untuk konservasi sumber daya genetik dan produksi unggas transgenik (Nakamura et al. 2013). Aplikasi yang utama dari teknologi PGC adalah untuk pelestarian plasma nutfah dari jenis unggas langka (Glover & McGrew 2012). Tulisan ini ditujukan untuk menguraikan teknologi isolasi dan koleksi PGC gonad untuk pelestarian sumber daya genetik plasma nutfah unggas lokal di Indonesia.

PERKEMBANGAN MORFOLOGI GONAD AYAM

Perkembangan gonad adalah sebuah rangkaian proses yang berurutan dan dapat dibagi menjadi tiga bagian, yaitu migrasi PGC, penentuan jenis kelamin dan diferensiasi gonad dimana semua proses tersebut berjalan dalam lima fase. Fase pertama, pada tahap 1, PGC ayam berada pada bagian ventral area pelusida (Tsunekawa et al. 2000). Fase kedua, tahap 2-6, secara bertahap PGC meninggalkan epiblas untuk bermigrasi ke permukaan hipoblas secara kontinyu. Pada waktu yang bersamaan, terjadi proses gastrulasi yang menggerakkan hipoblas ke arah anterior yang secara langsung menghanyutkan PGC menuju *germinal crescent*. Migrasi PGC akan terhenti pada akhir proses gastrulasi (Ginsburg 1997). Fase ketiga, tahap 7-12, dampak pergerakan sebelumnya membuat lapisan mesoderm mencapai daerah *germinal crescent* dan PGC sudah berada di antara lapis endoderm dan ektoderm. Selanjutnya, sel-sel pada mesoderm membentuk pulau-pulau darah dan PGC segera bergerak secara aktif menembus/memasuki pembuluh darah. Ketika sistem peredaran darah terbentuk sempurna pada tahap 12, maka PGC akan terhanyut dalam sirkulasi peredaran darah (D'Costa et al. 2001). Fase keempat, tahap 13-16, PGC masih tetap berada di pembuluh darah (Meyer 1964) dan memasuki tahap 17-19 PGC mulai meninggalkan pembuluh darah.

Fase kelima, tahap 20-36, pada tahap 20, sebagian besar PGC telah meninggalkan pembuluh darah dan banyak yang telah tiba di *gonadal anlage* (bakal gonad) (Ukeshima et al. 1991) dan pembentukan jenis kelamin dimulai. Pada tahap 21-22, gonad menonjol keluar dari sudut dorsal rongga selom dan bentuk asimetri antara gonad kiri dan kanan terus meningkat. Tahap 23-24, gonadogenesis dimulai setelah 72 jam masa inkubasi (Hamburger & Hamilton 1951). Pada tahap 25, *genital ridges* menonjol ke dalam rongga selom sebagai organ yang berbeda disebut epitel *germinal* dalam *epithelial cords*. Organ ini berasal dari *germinal epithelium* dan mesonefrik (Sekido & Lovell-Badge 2007). Perbedaan antara organ reproduksi jantan dan betina terlihat lebih

nyata dari morfologi asimetri antara gonad kiri dan kanan yaitu pada penebalan lapisan epitel gonad kiri yang lebih tebal dari yang kanan (Carlson & Stahl 1985). Pada tahap 26 genital (*gonadal ridges*) belum tampak jelas secara makroskopik dengan ukuran panjang 1,5 mm dan lebar 0,1 mm (Carlson & Stahl 1985). Gambaran asimetris ini dipertahankan pada kedua jenis kelamin sampai penentuan seks gonad (tahap 27-28).

Diferensiasi seks gonad dimulai pada tahap 29, sel-sel epitel mengelilingi gonad secara merata dan membentuk *squamous* dimana asimetri gonad kiri dan kanan pada kedua jenis kelamin secara bertahap mulai tampak semakin jelas (Carlson & Stahl 1985). Diferensiasi terus berlangsung, perbedaan morfologi antara gonad kiri dan kanan pada betina menjadi lebih jelas dan asimetri antara gonad jantan berkurang. Pada tahap 30-33, situasi ini terus berlanjut hanya pada gonad kiri betina, sedangkan sel germinal terdistribusi secara acak di seluruh gonad betina dan kedua gonad jantan. Pada tahap 34-35, PGC pada gonad kiri betina mulai berdiferensiasi menjadi oosit primer.

Pada tahap 36, gonad jantan dan betina terlihat jelas perbedaannya dimana gonad betina memiliki ukuran yang lebih kecil dari testis. Testis kanan dan kiri membentuk struktur tubular dengan panjang 5 mm dan lebar 1,5 mm sedangkan pada betina panjang gonad kanan 2,6 mm dan lebar 0,5 mm dan gonad kiri memiliki panjang 3,2 mm dan lebar 0,8 mm (Carlson & Stahl 1985). Sepanjang perkembangan embrio, organ reproduksi jantan dan betina terus meningkat sampai menjelang menetas.

ISOLASI GONADAL PRIMORDIAL GERM CELL DI BALAI PENELITIAN TERNAK

Isolasi gPGC pada unggas dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya menggunakan proteinase K (Tajima et al. 1998), *fluorescence-activated cell sorting* (Mozdziaik et al. 2005), *magnetic-activated cell sorting* (Kim et al. 2005) dan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) (Nakajima et al. 2011).

Proteinase K

Proteinase K umumnya digunakan dalam aplikasi biologi molekuler untuk mencerna protein yang tidak diinginkan. Proteinase K digunakan untuk menghancurkan protein dalam jaringan dan kultur sel, serta membebaskan asam nukleat yang sangat efektif menonaktifkan DNA dan RNA. Metode ini efektif dalam isolasi gPGC dengan tingkat kemurnian tinggi. Kelemahannya memerlukan tambahan enzim dalam proses pemurnian (Tajima et al. 1998).

Fluorescence-activated cell sorting

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) digunakan untuk memurnikan populasi sel (Basu et al. 2010). Metode ini mampu mengisolasi gonad embrio dan populasi sel darah untuk PGC, tetapi tidak dapat mengevaluasi sel germinal. Kelemahannya memerlukan peralatan mahal dan gPGC yang diperoleh rendah antara 53-73% (Mozdziak et al. 2005).

Magnetic-activated cell sorting

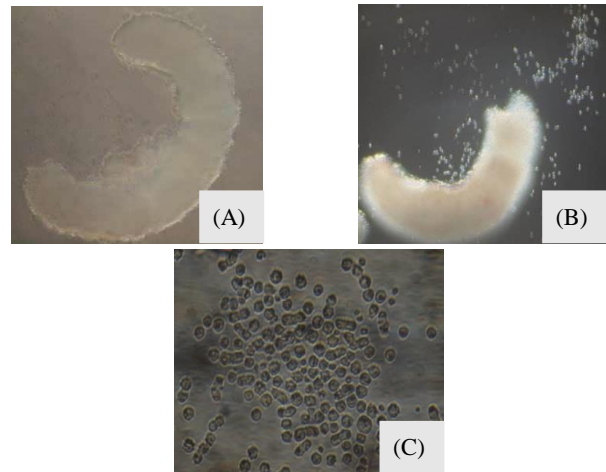
Magnetic-activated cell sorting (MACS) merupakan metode pemurnian gPGC menggunakan medan magnet, pengikatan antibodi dan *MACS buffer* serta *mini MACS system* untuk memisahkan sel PGC dari sel lainnya. Pada ayam, MACS berhasil mendapatkan gPGC murni sebesar 16,7 kali lebih besar dari teknik lainnya melalui kultur PGC (Kim et al. 2005). Kelemahannya memerlukan bahan dan peralatan mahal.

Phosphate-buffered saline

Metode isolasi gPGC menggunakan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) merupakan cara sederhana untuk isolasi gPGC ayam yang berasal dari jaringan gonad. Keuntungan dari isolasi gPGC menggunakan larutan PBS adalah gPGC dapat dikumpulkan dalam waktu singkat, tidak memerlukan peralatan mahal dan tingkat kemurnian yang diperoleh sangat tinggi, yaitu 95% (Nakajima et al. 2011).

Berdasarkan keuntungan dan kerugian dari masing-masing metode tersebut, maka isolasi gPGC yang dilakukan di Balai Penelitian Ternak (Balitnak) adalah dengan menggunakan larutan PBS dan waktu inkubasi selama satu jam pada suhu 37,8°C (Nakajima et al. 2011) dengan sedikit modifikasi dan terbukti sukses pada isolasi PGC dari unggas di Indonesia.

Penggunaan larutan PBS adalah sebagai penyangga untuk mempertahankan pH tetap konstan, menjaga keseimbangan osmotik serta mempertahankan kecukupan air dalam sel dan ion anorganik agar sel tetap dalam kondisi baik. Hasil isolasi gPGC dari ayam lokal dan asli Indonesia sampai dengan satu jam masa inkubasi memperlihatkan sel tetap dalam kondisi baik, tidak cacat, ukuran sama besar dan simetris (Gambar 4a, 4b dan 4c) (Kostaman 2013; Kostaman & Sopiyan 2015). Pada ayam KUB berhasil dipanen gPGC 148 sel per embrio.



(A) Gonad embrio ayam KUB umur tujuh hari; (B) Setelah 0,5 jam masa inkubasi; (C) *Gonadal primordial germ cell* yang berhasil diisolasi setelah satu jam masa inkubasi

Gambar 4. Proses pelepasan gPGC dari gonad embrio ayam KUB setelah inkubasi di larutan PBS

Sumber: Koleksi pribadi

KRIOPRESERVASI GONADAL PRIMORDIAL GERM CELL

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan material genetik beku dalam nitrogen cair (-196°C). Keuntungan teknik penyimpanan ini, yaitu efisien dari segi biaya, waktu penyimpanan panjang, ruang penyimpanan sempit dan tenaga yang dibutuhkan sedikit, serta mudah untuk dibawa ke tempat lain (Sawicka et al. 2011).

Teknik kriopreservasi *ex situ* pada unggas yang populer saat ini adalah semen beku (Hammerstedt 1995). Fertilitas semen segar dan beku pada unggas lebih rendah dibandingkan dengan spesies lain sehingga perlu banyak penyempurnaan sebelum digunakan dalam industri perunggasan (Chalah et al. 1999). Kriopreservasi oosit dan embrio unggas belum dikembangkan, karena karakteristik fisiologis dan anatominya yang unik. Kriopreservasi gPGC dapat menjadi pilihan yang lebih baik untuk penyimpanan material genetik unggas (Nakamura et al. 2013).

Squires et al. (2004) dan Alvarenga et al. (2005) berpendapat bahwa dasar pemilihan krioprotektan yang akan digunakan untuk kriopreservasi adalah (1) Mampu melindungi sel selama pembekuan; (2) Mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat masuk ke dalam sel, serta mengurangi

toksitas akibat osmolaritas yang tinggi; dan (3) Mudah larut dalam air. Pada dasarnya tujuan utama dari kriopreservasi gPGC adalah melestarikan plasma nutfah unggas yang mendekati kepunahan. Penyebab utama kerusakan dalam kriopreservasi gPGC selama pembekuan adalah tergantung pada jumlah air bebas dan air yang mengkristal. Selama pembekuan, sebagian besar air berubah menjadi es dan metabolisme sel berhenti (Best 1990).

Beberapa krioprotektan yang telah digunakan dalam kriopreservasi sel germinal pada unggas adalah *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Moore et al. 2006; Setioko et al. 2007; Kostaman & Setioko 2011; Kim et al. 2013b; Sawicka et al. 2015) dan etilen glikol (GE) (Kobayashi et al. 2003; Moore et al. 2006; Kim et al. 2013b). Keuntungan dan kerugian dari krioprotektan di atas telah dilaporkan oleh Kostaman & Setioko (2011).

Untuk melihat keberhasilan kriopreservasi gPGC secara *in vitro*, dapat dilihat dari jumlah sel yang berhasil pulih setelah pembekuan (*recovery rate*) dan viabilitasnya. Contoh hasil *recovery rate* dan viabilitas kriopreservasi gPGC tertera pada Tabel 1. *Recovery rate* maksimum tergantung pada berkurangnya pembentukan kristal es intraselular dan kerusakan kriogenik yang disebabkan oleh konsentrasi larutan yang tinggi pada saat cairan intraselular membeku (Setioko 2008).

Dua pendekatan yang digunakan untuk meningkatkan *recovery rate* dan viabilitas adalah (1) Pendinginan sel secara bertahap sampai tingkat terendah tanpa menyebabkan pembentukan es intraseluler; dan (2) Penambahan berat molekul senyawa rendah dengan *cryomedium*. Perbaikan lebih lanjut diperlukan, seperti untuk tingkat pendinginan dan pemanasan, serta jenis dan konsentrasi agen krioprotektan (Nakamura et al. 2013). Jadi, kriopreservasi gPGC adalah strategi yang layak digunakan untuk konservasi plasma nutfah unggas jantan dan betina (Nakamura et al. 2013).

Tabel 1. Kualitas gPGC unggas setelah pembekuan

Jenis ayam	Kualitas gPGC		Sumber
	<i>Recovery rate</i>	Viabilitas	
Broiler (42L)	39,4±6,5%	-	Tajima et al. (2003) ^{1, A}
White Leghorn	36,8±1,5%	-	Kohara et al. (2008) ^{2, A}
White Leghorn	56,7±3,0%	-	Kohara et al. (2008) ^{1, A}
Korean native chicken	-	50,39	Kim et al. (2013a) ^{1, B}
Korean native chicken	-	64,36	Kim et al. (2013a) ^{1, C}

¹Metode pembekuan lambat; ²Metode vitrifikasi; ^ADMSO + Fetal Bovine Serum (FBS) 10%; ^BDMSO + FBS 15%; ^CEG + FBS 10%

PEMANFAATAN GONADAL PRIMORDIAL GERM CELL UNTUK PELESTARIAN PLASMA NUTFAH UNGGAS DI INDONESIA

Untuk mempertahankan keberadaan plasma nutfah unggas, khususnya ayam, maka sejak tahun 2008 Balitnak mulai melakukan penelitian dan penyimpanan material genetik dari PGC yang diisolasi dari sirkulasi darah embrio ayam-ayam lokal Indonesia dikenal sebagai PGC-sirkulasi. Material genetik dari PGC dapat digunakan untuk pengembangan unggas di masa mendatang.

PGC-sirkulasi ayam lokal Indonesia jumlahnya relatif masih rendah jika dibandingkan dengan PGC-sirkulasi ayam ras (Kostaman et al. 2013). Konsentrasi PGC-sirkulasi tertinggi, yaitu pada tahap 14 atau 15 pada embrio ayam (Tajima et al. 1999). Waktu inkubasi yang diperlukan untuk mencapai tahap 14-15 bervariasi antara individu embrio (Tajima et al. 1999). Proporsi PGC terhadap sel darah 0,02% (Yasuda et al. 1992). Oleh karena itu, untuk menjamin perolehan koleksi PGC-sirkulasi pada tahap 14-15 untuk menghasilkan *germline chimera* dibutuhkan jumlah telur fertil yang banyak.

Untuk mengurangi penggunaan telur fertil, sejak tahun 2015 dilakukan penelitian membandingkan hasil isolasi PGC yang berasal dari gonad dan dari sirkulasi. Hasil sementara menunjukkan bahwa gPGC gonad jumlahnya tiga kali lipat lebih banyak dari PGC-sirkulasi (Kostaman & Sopiya 2015) yang akan berdampak pada penggunaan telur fertil yang lebih sedikit dalam membuat *germline chimera*.

Beberapa peneliti berhasil melakukan transfer gPGC yang di isolasi dari gonad embrio ayam umur tujuh hari masa inkubasi (Nakajima et al. 2011) ke dalam aliran darah embrio resipien dan mampu berdiferensiasi tumbuh menjadi gamet normal pada gonad resipien (Tajima et al. 2004; Kim et al. 2005; Park et al. 2008; Nakajima et al. 2011; 2012). Jadi gPGC yang telah dibekukan dapat digunakan untuk menghasilkan keturunan ayam yang sehat melalui ayam *germline chimera*, antara lain menghasilkan ayam dengan ayam hutan (Kang et al. 2009) dan ayam dengan itik (Liu et al. 2012). Selain itu, metode isolasi gPGC dapat digunakan dalam pembentukan sistem manajemen reproduksi spesies spesifik untuk keberhasilan konservasi sumber daya genetik unggas (Glover & McGrew 2012).

Teknologi ini diharapkan dapat membantu dalam mempelajari perkembangan sel germinal, konservasi sumber daya genetik, produksi hewan transgenik dan mempertahankan plasma nutfah sehingga mengurangi biaya pemeliharaan ternak unggas agar aman dari *outbreak* penyakit menular dan bencana alam. Manfaat ini terutama disadari ketika teknologi *germline chimera* dikombinasikan dengan kriopreservasi gPGC sehingga

memungkinkan perbaikan jangka panjang dari sumber daya genetik unggas yang hampir punah/langka. Selain itu, teknologi *germline chimera* mungkin dapat mengurangi dampak lingkungan yang berpotensi negatif dari strategi konvensional *ex situ* untuk melestarikan sumber daya genetik unggas (Nakajima & Tajima 2013). Ringkasan beberapa aplikasi dan keberhasilan penggunaan PGC pada unggas disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Aplikasi penggunaan *primordial germ cell* unggas

Hasil Penelitian	Pustaka
Keberhasilan pengembangan ayam transgenik	Salter et al. (1986)
Dihasilkan pertama kali ayam <i>germline chimeric</i>	Petitte et al. (1990)
Dihasilkan burung transgenik dari transfer PGC	Vick et al. (1993)
Pluripotent <i>embrionic stem cell</i> (ESC) yang berasal dari <i>blastoderm</i>	Pain et al. (1996)
Chimera somatik menghasilkan sejumlah besar antibodi terapeutik di dalam putih telur	Zhu et al. (2005)
Pertumbuhan <i>germline</i> secara <i>in vitro</i> , dan rekayasa genetika PGC	van de Lavoie et al. (2006)
Penekanan penularan flu burung pada rekayasa genetika ayam	Lyall et al. (2011)
Penggunaan transposon untuk memodifikasi genom ayam	Macdonald et al. (2012); Park & Han (2012); Yang & Kim (2012)
Kultur epitel saluran telur ayam	Kasperczyk et al. (2012)

Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan) mencanangkan komitmen untuk berperan aktif dalam mendukung kegiatan pelestarian sumber daya genetik lokal (SDGL) dengan mendirikan *gene bank* sebagai tempat penyimpanan gen-gen SDGL dalam bentuk kriopreservasi termasuk penyimpanan gPGC ayam lokal Indonesia.

KESIMPULAN

Koleksi PGC dari gPGC saat ini merupakan pilihan terbaik dari teknologi koleksi PGC yang ada dan sudah dikuasai dengan baik di Indonesia. Hal ini karena jumlah gPGC yang dipanen lebih banyak dibandingkan dengan metode isolasi PGC yang berasal dari sumber lain. Hal tersebut akan mempermudah dalam aplikasi teknologi konservasi dengan pembentukan *germline chimera* dalam rangka mempertahankan keberadaan plasma nutfah unggas

lokal dan asli yang ada di Indonesia dan pengembangan unggas transgenik untuk industri ke depan.

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.
- Aramaki S, Kubota K, Soh T, Yamauchi N, Hattori MA. 2009. Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells. *J Reprod Dev.* 55:214-218.
- Aramaki S, Sato F, Kato T, Soh T, Kato Y, Hattori MA. 2007. Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Res.* 330:45-52.
- Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. 2010. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp.* 41:1-4.
- Best B. 1990. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryogenics. BenBest [Internet]. [cited 1 May 2013]. Available from: <http://www.benbest.com/pdf>
- Carlson N, Stahl A. 1985. Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 74:52-59.
- Chalah T, Seigneurin F, Bleisbos E, Brillard JP. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology.* 39:185-191.
- Chojnacka-Puchta L, Kasperczyk 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.
- D'Costa S, Pardue SL, Petitte JN. 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poult Biol Rev.* 12:151-168.
- 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 germlasm 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.* 88:45-92.
- Hammerstedt RH. 1995. Cryopreservation of poultry semen-current status and economics. In: Bakst MR, Wishart GJ, editors. *Proceeding 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry.* Savoy (US): Poultry Science Association. p. 229-250.

- Han JY, Park TS, Hong YH, Jeong DK, Kim JN, Kim KD, Lim JM. 2002. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained *in vitro* for an extended period. *Theriogenology*. 58:1531-1539.
- 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.
- Kasperczyk K, Bajek A, Joachimiak R, Walasik K, Marszalek A, Drewa T, Bednarczyk M. 2012. *In vitro* optimization of the *Gallus domesticus* oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology*. 77:1834-1845.
- Kim H, Kim DH, Han JY, Choi SB, Ko YG, Do YJ, Seong HH, Kim SW. 2013a. The effect of modified cryopreservation method on viability of frozen-thawed primordial germ cell on the Korean native chicken (Ogye). *J Anim Sci Technol*. 55:427-434.
- Kim H, Kim DH, Han JY, Do YJ, Kim JH, Kim YS, Seong HH, Ko YG, Kim SW. 2013b. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from Korean native chicken (Ogye) embryos using commercial cryoprotectants. *Korean J Poult Sci*. 40:163-169.
- 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.
- Kito G, Aramaki S, Tanaka K, Soh T, Yamauchi N, Hattori M. 2010. Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J Reprod Dev*. 56:341-346.
- Kobayashi T, Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol Biochem*. 28:479-480.
- 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.
- 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.
- Kostaman T, Setioko AR. 2011. Perkembangan penelitian teknik kriopreservasi untuk penyimpanan semen unggas. *Wartazoa*. 21:145-152.
- Kostaman T, Sopiya S. 2015. Isolasi *gonadal germ cell* (GGC) dari perkembangan awal embrio ayam Kampung Unggul Badan Litbang Pertanian (KUB). Dalam: Darodjah S, Setiawan I, Susilawati I, Sulistyati M, Hidayati YA, penyunting. Prosiding Seminar Nasional Peternakan Berkelanjutan 7. Sumedang, 11 November 2015. Sumedang (Indonesia): Universitas Padjadjaran; p. 44-48.
- Kostaman T, Yusuf TL, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. Isolasi dan jumlah *primordial germ cell* sirkulasi (PGC-sirkulasi) pada stadium perkembangan embrio ayam Gaok. *JITV*. 18:27-33.
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, et al. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*. 441:766-769.
- Liu C, Khazanehdari KA, Baskar V, Saleem S, Kinne J, Wernery U, Chang IK. 2012. Production of chicken progeny (*Gallus gallus domesticus*) from interspecies germline chimeric duck (*Anas domesticus*) by primordial germ cell transfer. *Biol Reprod*. 86:1-8.
- Lyall J, Irvine RM, Sherman A, McKinley TJ, Núñez A, Purdie A, Outtrim L, Brown IH, Rolleston-Smith G, Sang H, Tiley L. 2011. Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. *Science*. 331:223-226.
- Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ. 2012. PNAS plus: efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci*. 109:E1466-E1472.
- Meyer DB. 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev Biol*. 10:154-190.
- Moore DT, Purdy PH, Blackburn HD. 2006. A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poult Sci*. 85:1784-1790.
- Mozdziaik PE, Angerman-Stewart J, Rushton B, Pardue SL, Petite JN. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult Sci*. 84:594-600.
- Nakajima Y, Minematsu T, Naito M, Tajima A. 2011. A new method for isolating viable gonadal germ cells from 7-day-old chick embryos. *J Poult Sci*. 48:106-111.
- Nakajima Y, Naito M, Tajima A. 2012. Production of germline chimeras by the transfer of gonadal germ cells (GGCs) recovered from 7-day-old chick embryos by using newly developed PBS [-] method. *World Poult Sci J*. 68:2012.
- Nakajima Y, Tajima A. 2013. Development of a novel method for isolating gonadal germ cells from early chick embryos. *J Dev Sustain Agric*. 8:75-78.
- Nakamura Y, Tasai M, Takeda K, Nirasawa K, Tagami T. 2013. Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese Quail. *J Reprod Dev*. 59:580-587.
- Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem

- cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*. 122:2339-2348.
- Park TS, Han JY. 2012. PiggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:9337-9341.
- Park TS, Kim MA, 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.
- Petitte JN, Clark ME, Liu G, Gibbins AM V, Etches RJ. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*. 108:185-189.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Fadly AM, Witter RL, Crittenden LB. 1986. Gene insertion into the chicken germline by retroviruses. *Poult Sci*. 65:1445-1458.
- Sawicka D, Brzezinska J, Bednarczyk M. 2011. Cryoconservation of embryonic cells and gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Folia Biol*. 59:1-5.
- Sawicka D, Chojnacka-Puchta L, Zielinski M, Plucienniczak G, Plucienniczak A, Bednarczyk M. 2015. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell Mol Biol Lett*. 20:143-159.
- Sekido R, Lovell-Badge R. 2007. Mechanisms of gonadal morphogenesis are not conserved between chick and mouse. *Dev Biol*. 302:132-142.
- Setioko AR. 2008. Konservasi plasma nutfah unggas melalui kriopreservasi *primordial germ cells* (PGCs). *Wartazoa*. 8:68-77.
- 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.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 62:1056-1065.
- 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.
- Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, Chikamune T. 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J Exp Zool*. 284:759-764.
- Tajima A, Minematsu T, Ohara M. 2004. Production of germ-line chimeras by the transfer of cryopreserved gonadal germ cells collected from 7 and 9-day old chick embryos. *J Anim Sci*. 75:85-88.
- Tajima A, Naito M, Yasuda Y, Kuwana T. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J Exp Zool*. 280:265-267.
- 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.
- Ukeshima A, Yoshinaga K, Fujimoto T. 1991. Scanning and transmission electron microscopic observations of chick primordial germ cells with special reference to the extravasation in their migration course. *J Electron Microsc*. 40:124-128.
- Vick L, Li Y, Simkiss K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc R Soc B*. 251:179-182.
- Yang JH, Kim S. 2012. Establishment of an efficient and stable transgene expression system in chicken primordial germ cell. *Bull Korean Chem Soc*. 33:1536-1540.
- Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. 1992. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J Reprod Fertil*. 96:521-528.
- Zhu L, van de Lavoie MC, Albanese J, Beenhouwer DO, Cardarelli PM, Cuisson S, Deng DF, Deshpande S, Diamond JH, Green L, et al. 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol*. 23:1159-1169.