

Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2014

Efektivitas Pembekuan terhadap *Recovery Rate* dan Viabilitas *Primordial Germ Cells* Ayam Lokal Indonesia

(Effectivity of Freezing on the Recovery Rate and Viability of Primordial Germ Cells of Native Indonesian Chicken)

Tatan Kostaman, Sopiya S

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

ABSTRACT

The objective of this study was to examine effectivity of two freezing (slow and rapid) methods on recovery rate and viability of PGCs in native Indonesian chicken after freezing thawing. The blood was collected from embryos of native chickens at stages of 14-16 through dorsal aorta using a micropipette under a microscope. PGCs were then purified by nycodenz density gradient centrifugation. In slow freezing process, about 50 PGCs were placed in cryotube and then inserted into the Nalgene® Cryo Freezing Container and freeze at a temperature of -80°C for one night. PGCs were then directly plunged into liquid nitrogen (-196°C). In rapid freezing process, about 50 PGCs were placed in 0.5 ml straw and equilibrated at 5°C in cooling chamber. Thereafter, PGCs were placed at the liquid nitrogen for four minutes, then directly plunged into liquid nitrogen. Results indicate that the percentage recovery rate of native chicken PGCs to slow freezing (42.33%), significantly ($P<0.05$) higher than that of rapid freezing (21%). Similarly to the percentage viability, but no different between three breeds of chicken on both recovery rate and viability. It is concluded that cryopreservation of PGCs of native chicken with slow freezing resulted in better recovery rates and better viability than that of rapid freezing.

Key Words: Native Chicken, Freezing, PGCs, Recovery Rate, Viability

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah menguji dua metode pembekuan (lambat dan cepat) terhadap *recovery rate* dan viabilitas *primordial germ cells* (PGCs) ayam lokal pasca-*thawing*. Darah dikoleksi dari embrio ayam lokal pada *stage* 14-16 di bagian aorta dorsalis dengan menggunakan mikropipet di bawah mikroskop. Selanjutnya PGCs dimurnikan dengan metode *nycodenz density gradient centrifugation*. Pada proses pembekuan lambat, sekitar 50 PGCs ditempatkan di dalam *cryotube*, kemudian dimasukkan ke dalam Nalgene® Cryo 1° *freezing* kontainer dan dibekukan pada suhu -80°C selama satu malam. Setelah itu, PGCs dimasukkan ke dalam nitrogen cair (-196°C). Pada pembekuan cepat, sekitar 50 PGCs ditempatkan dalam *straw* 0,5 ml dan diekuilibrasikan pada suhu 5°C di dalam mesin pendingin selama 15 menit. Kemudian, sampel diletakkan di atas uap nitrogen cair selama empat menit dan setelah itu langsung dimasukkan ke dalam kontainer nitrogen cair. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase *recovery rate* PGCs ayam lokal untuk pembekuan lambat (42,33%) nyata ($P<0,05$) lebih tinggi daripada pembekuan cepat (21%). Begitu juga untuk persentase viabilitas tetapi tidak ada perbedaan yang nyata untuk *recovery rate* dan viabilitas ketiga jenis ayam lokal. Dapat disimpulkan bahwa kriopreservasi PGC ayam lokal dengan pembekuan lambat memberikan *recovery rate* dan viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan pembekuan cepat.

Kata Kunci: Ayam Lokal, Pembekuan, PGCs, *Recovery Rate*, Viabilitas

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat berlimpah, termasuk diantaranya adalah jenis-jenis ayam. Nataamijaya (2000) melaporkan bahwa diperkirakan terdapat 31

rumpun ayam lokal yang tersebar di Indonesia. Anonimous (2009) melaporkan bahwa dari 36 plasma nutfah unggas lokal Indonesia, 80% diantaranya sudah hampir punah.

Pendekatan yang mulai dikembangkan dewasa ini untuk melestarikan keanekaragaman

hayati adalah melalui konservasi material genetik dengan menerapkan kemajuan bioteknologi reproduksi, seperti teknik kriopreservasi. Kriopreservasi adalah penyimpanan material genetik dalam bentuk sel beku baik dalam bentuk semen, ovum ataupun embrio melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologi, biologi dan morfologi tetap ada. Keberhasilan kriopreservasi tidak terlepas dari kemampuan dalam mempertahankan kondisi sel sebagaimana awalnya.

Pada unggas, penyimpanan semen sudah banyak dilakukan, walaupun hasilnya masih sangat bervariasi karena fertilitas semen beku unggas lebih rendah dari semen mamalia (Long 2006). Menurut Blanco et al. (2000) dan Fulton (2006) fertilitas semen beku unggas pada berbagai jenis unggas sangat bervariasi. Sementara penyimpanan ovum dan embrio unggas sulit dilakukan karena struktur dan ukuran yang besar pada kuning telur (Song & Silversides 2007). Kriopreservasi *germ cell* memberikan alternatif untuk penyimpanan material genetik hewan jantan dan betina.

Primordial germ cells (PGCs) pertama kali terdeteksi pada embrio ayam oleh Swift tahun 1914 pada akhir proses gastrulasi (Ginsburg 1997). *Primordial germ cells* ayam dapat diidentifikasi menggunakan kriteria morfologi, seperti memiliki ukuran sel yang besar (14-19 μm), nukleus yang sperikal dan besar serta terdapat lemak refraktif pada sitoplasmanya sehingga PGCs dapat dibedakan dengan sel lainnya (Zhao & Kuwana 2003).

Primordial germ cells adalah progenitor sel telur dan spermatozoa dan mata rantai genetik diantara generasi (D'Costa et al. 2001; Mozdziaik et al. 2005). Pada saat ditelurkan, PGCs pada *stage blastoderm* berada di bagian tengah *area pellucida*. Perkembangan embrio selanjutnya, PGCs dapat ditemukan di bagian ekstra embrionik yang disebut dengan *germinal crescent*. Setelah itu, PGCs masuk ke sirkulasi pembuluh darah embrio dan bermigrasi ke *gonadal ridges* (Nakamura et al. 2007).

Keberhasilan kriopreservasi PGCs unggas telah dilaporkan Tajima et al. (2003) memperoleh persentase *recovery rate* ayam White Leghorn dengan metode filtrasi sebesar 39,4%. Setioko et al. (2007) melaporkan

bahwa rata-rata persentase *recovery rate* dan viabilitas dari PGCs ayam White Leghorn yang telah dibekukan dengan pembekuan lambat dan menggunakan krioprotektan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) masing-masing adalah 49,9 dan 83,5%. Sementara itu, untuk ayam lokal rata-rata persentase *recovery rate* dan viabilitas dengan tingkat penurunan suhu sebesar 0,5°C memberikan hasil masing-masing sebesar 43,9 dan 77,5% (Kostaman et al. 2011).

Tujuan penelitian ini adalah membandingkan dua metode pembekuan, yaitu lambat dan cepat pada proses kriopreservasi PGCs ayam lokal Indonesia terhadap *recovery rate* dan viabilitas PGCs pasca-*thawing*. Dari hasil penelitian diharapkan akan diperoleh metode kriopreservasi yang paling tepat untuk penyimpanan PGCs ayam lokal Indonesia.

MATERI DAN METODE

Telur fertil

Total telur fertil yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 210 butir berasal dari tiga jenis ayam lokal Kampung Unggulan Badan Litbang Pertanian (KUB), Sentul dan Gaok hasil inseminasi buatan. Telur ayam lokal tersebut diperoleh dari kompleks ayam Balai Penelitian Ternak (Balitnak). Manajemen pemeliharaan ayam dilakukan sesuai standar prosedur yang ada di Balitnak.

Koleksi darah embrio dan pemurnian PGCs

Sebanyak 30-40 butir telur segar dalam sekali penetasan dimasukkan ke dalam inkubator (P-008B Biotype; Showa Furanki, Saitama, Japan) dengan temperatur 38°C dan kelembaban relatif 68%. Pemutaran telur dilakukan setiap 30 menit sekali selama 50-54 jam untuk mendapatkan embrio pada *stage* 14-16 (Hamburger & Hamilton 1951). Sampel darah diambil dari bagian *aorta dorsalis* dengan menggunakan *fine glass micropipette* di bawah mikroskop (MS5; Leica Microsystems). Darah yang terkumpul ditempatkan pada tabung *ependorf* 1,5 ml yang sebelumnya telah diisi dengan 1.000 μl *phosphate buffer solution* (PBS). Selanjutnya dimurnikan dengan metoda *nycodenz gradient*

centrifugation seperti yang dilaporkan Zhao & Kuwana (2003).

Pembekuan dan *thawing* PGCs

Setelah mendapatkan PGCs yang murni, PGCs dikriopreservasi dengan dua metode, yaitu pembekuan lambat dan pembekuan cepat. Proses pembekuan lambat dilakukan dengan memasukkan sekitar 50 PGCs yang sudah ditambahkan larutan 10% dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai krioprotektan dan disuspensi ke dalam *cryotube* (Nalgene, NY, USA). *Cryotube* kemudian dimasukkan ke dalam tabung pembekuan (Nalgene® Cryo 1° *freezing container*) dan dibekukan dengan *deep freezer* (Linder & May Pty. Ltd.) dengan rata-rata penurunan suhu -1°C per menit sampai mencapai suhu -80°C. Setelah satu malam, *cryotube* dipindahkan ke dalam nitrogen cair (-196°C) dan disimpan selama satu minggu. Proses pembekuan cepat juga dilakukan dengan memasukkan sekitar 50 PGCs yang sudah ditambahkan larutan 10% DMSO dan disuspensi ke dalam *straw* 0,5 ml, kemudian diekuilibrasi di mesin pendingin pada suhu 5°C selama 15 menit. Pembekuan diawali dengan meletakkan *straw* di atas uap nitrogen cair (suhu sekitar -110°C) selama empat menit. Kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan ke dalam kontainer selama satu minggu, seperti pada proses pembekuan lambat. Setelah itu, *cryotube* dan *straw* diambil dari nitrogen cair dan di-*thawing* dengan cara dimasukkan ke *water bath* pada suhu 39°C sampai seluruh es mencair. Sesudah *thawing*, larutan PGCs ditambah dengan 1.000 µl FBS-PBS dan disentrifugasi pada kecepatan 1.200 rpm selama tujuh menit untuk menghilangkan krioprotektan. Supernatan dibuang dan peletnya (± 20 µl) dipindahkan ke cawan petri untuk diuji karakteristiknya dengan menghitung viabilitas dan *recovery rate* di bawah mikroskop (Olympus CKX41). *Recovery rate* dihitung dengan membagi jumlah PGCs setelah *thawing* dengan jumlah PGCs sebelum pembekuan dikalikan 100%, sedangkan viabilitas PGCs dihitung dari jumlah PGCs hidup setelah *thawing* dibagi dengan jumlah PGCs sebelum *thawing* dikalikan 100%.

Analisis data

Data *recovery rate* dan viabilitas dianalisis secara statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 3x2, faktor pertama adalah tiga jenis ayam lokal (KUB, Sentul dan Gaok) dan faktor kedua adalah metode pembekuan (lambat dan cepat). Untuk melihat perbedaan nilai rata-rata dilanjutkan dengan uji *duncan multiple range test* (SPSS versi 17).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Recovery rate setelah *freezing* dan *thawing*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada interkasi antara jenis ayam dan metode pembekuan pada *recovery rate* PGC's. Selanjutnya pengujian menunjukkan bahwa rata-rata persentase *recovery rate* PGCs setelah *freezing* dan *thawing* berbeda nyata ($P < 0,05$) untuk metode pembekuan lambat dan cepat masing-masing 42,33 dan 21% (Tabel 1). Hal ini kemungkinan disebabkan krioprotektan DMSO pada pembekuan cepat tidak mampu melindungi membran sel sehingga banyak sel yang mati. Sebaliknya pada pembekuan lambat, persentase *recovery rate* lebih tinggi diduga disebabkan oleh adanya kemampuan interaksi antara krioprotektan DMSO dengan membran sel.

Tabel 1. Rata-rata persentase *recovery rate* PGCs dari tiga jenis ayam dengan metode pembekuan lambat dan cepat

Jenis ayam	Pembekuan lambat (%)	Pembekuan cepat (%)
KUB (n = 10)	41,80 \pm 6,97 ^a	20,00 \pm 4,32 ^b
Sentul (n = 10)	40,10 \pm 4,86 ^a	22,67 \pm 4,29 ^b
Gaok (n = 10)	44,20 \pm 4,57 ^a	20,33 \pm 5,55 ^b
Rata-rata	42,33 \pm 5,47 ^a	21,00 \pm 4,72 ^b

^{a, b}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$); KUB: Kampung Unggulan Badan Litbang Pertanian

Menurut Havez (2000) *recovery rate* diamati untuk mengevaluasi pengaruh krioprotektan terhadap daya hidup sel setelah proses kriopreservasi. Krioprotektan yang

digunakan pada penelitian ini adalah DMSO, karena merupakan krioprotektan yang sering dipakai untuk pembekuan sel atau jaringan secara umum serta pembekuan ovarium konvensional. Dimetil sulfoksida adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ dan mempunyai berat molekul sebesar 78,13.

Kemampuan proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikator dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses *thawing* (Supriatna & Pasaribu 1992). Dengan terpeliharanya keutuhan fisik membran sel dan fungsinya, maka proses metabolisme dari PGCs selama proses pendinginan, pembekuan dan selama penyimpanan di dalam nitrogen cair akan tetap berlangsung dengan baik sehingga menjaga kelangsungan hidupnya (Kusumaningrum et al. 2002). Akan tetapi, rata-rata persentase *recovery rate* PGCs setelah *freezing-thawing* untuk ayam lokal pada penelitian ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan *recovery rate* PGC ayam ras, seperti yang telah dilaporkan oleh Setioko et al. (2007) dan Nakamura et al. (2011) masing-masing sebesar 49,9 dan 54,3%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan lingkungan penelitian.

Viabilitas PGCs setelah *freezing* dan *thawing*

Rata-rata persentase viabilitas PGCs ayam lokal setelah *freezing-thawing* disajikan pada Tabel 2. Sama dengan persentase *recovery rate*, tidak ada interaksi antara jenis ayam dan metode pembekuan pada nilai viabilitas PGC's. Persentase viabilitas PGCs ayam lokal setelah *freezing-thawing* berbeda nyata di antara dua metode pembekuan (lambat dan cepat). Rata-rata persentase viabilitas PGCs hasil penelitian yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya, yaitu 83,5% (Setioko et al. 2007) dan 85,7% (Nakamura et al. 2011). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkungan penelitian.

Rendahnya viabilitas pada pembekuan cepat dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, konsentrasi krioprotektan yang digunakan tidak memadai untuk mencegah pembentukan kristal es intraseluler. Kristal es intraseluler secara mekanis dapat merusak organel sel, sehingga menyebabkan kematian sel (Gao & Critser 2000). Kristal es intraseluler ini dapat merusak membran intraseluler. Tingkat kerusakan yang disebabkan oleh terbentuknya kristal es intraseluler ini lebih ditentukan oleh volume total es intraseluler dibandingkan oleh ukuran individual kristal-kristal es tersebut. Selain itu, pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada saat pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati (Sari 2002). Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson 2000). Kedua, penggunaan kemasan *straw* 0,5 ml juga diduga dapat menurunkan viabilitas PGCs, karena dapat meningkatkan volume larutan dan *barrier* antara larutan dengan nitrogen cair sehingga mengurangi kecepatan penurunan suhu (Mohamad et al. 2005). Ketiga, Kemungkinan yang paling nyata dari data ini adalah ukuran PGCs lebih kecil dibandingkan dengan ukuran embrio hewan mamalia (sapi, kerbau, domba dan kambing), sehingga dapat menyebabkan perbedaan sensitivitas terhadap kriopreservasi.

Tabel 2. Rata-rata persentase viabilitas PGCs dari tiga jenis ayam dengan metode pembekuan lambat dan cepat

Jenis ayam	Pembekuan lambat (%)	Pembekuan cepat (%)
KUB (n = 10)	74,03±5,33 ^a	63,02±3,51 ^b
Sentul (n = 10)	76,43±3,66 ^a	62,74±4,12 ^b
Gaok (n = 10)	76,61±7,58 ^a	62,51±3,86 ^b
Rata-rata	75,69±5,52 ^a	62,75±3,83 ^b

^a, ^bSuperskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$); KUB: Kampung Unggulan Badan Litbang Pertanian

Pada penelitian ini, tiga jenis ayam (KUB, Sentul dan Gaok) digunakan sebagai model untuk konservasi. Baik pada pembekuan lambat maupun cepat tidak menunjukkan perbedaan yang nyata diantara tiga jenis ayam pada persentase *recovery rate* dan viabilitas PGCs setelah *freezing* dan *thawing*. Hal ini menunjukkan bahwa *recovery rate* dan viabilitas PGCs tidak dipengaruhi oleh jenis ternak, seperti yang telah dilaporkan oleh Nakamura et al. (2011).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian, dapat ditarik kesimpulan bahwa kriopreservasi PGCs ayam lokal dengan pembekuan lambat memberikan *recovery rate* dan viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan pembekuan cepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari DIPA APBN 2012 Balitnak. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada rekan-rekan di kandang ayam atas bantuannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2009. Terancam punah, 80% plasma nutfah unggas lokal. Kompas.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod.* 63:1164-1171.
- D'Costa SD, Pardue SL, Petite JN. 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poult Biol Rev.* 12:151-168.
- Fulton JE. 2006. Avian genetic stock preservation: an industry perspective. *Poult Sci.* 85:227-231.
- Gao D, Critser JK. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41:187-196.
- Ginsburg M. 1997. Primordial germ cell development in avians. *Poult Sci.* 76:91-95.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chicken. *J Morphol.* 88:49-92.
- Havez ESE. 2000. Preservation and cryopreservation of gamet and embryo. In: Havez B, Havez ESE, editors. *Reprod farm anim.* 7th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins.
- Kostaman T, Sopiyan S, Setioko AR. 2011. Tingkat penurunan suhu pada kriopreservasi *primordial germ cells* (PGCs) dari tiga jenis ayam lokal Indonesia. *JITV.* 16:218-223.
- Kusumaningrum DA, Situmorang P, Setioko AR, Sugiarti T, Triwulanningsih E, Sianturi RSG. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entok. *JITV.* 7:244-250.
- Long JA. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poult Sci.* 85:232-236.
- 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.
- 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.
- 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. 2000. Ayam Kampung Indonesia. *Bull Plasma Nutfah.* 6:1-6.
- Sari W. 2002. Efektivitas beberapa metode kriopreservasi terhadap daya tahan hidup morula dan blastosis [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Song Y, Silversides FG. 2007. Production of offspring from cryopreserved chicken testicular tissue. *Poult Sci.* 86:1390-1396.

- Supriatna I, Pasaribu FH. 1992. In vitro fertilization, transfer embrio dan pembekuan embrio. Bogor (Indonesia): PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 481-492.
- Zhao DF, Kuwana T. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br Poult Sci.* 44:30-35.