

Tingkat Penurunan Suhu pada Kriopreservasi Primordial Germ Cell (PGC) dari Tiga Jenis Ayam Lokal Indonesia

TATAN KOSTAMAN, S. SOPIYANA dan A.R. SETIOKO

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16720

(Diterima dewan redaksi 29 Juli 2011)

ABSTRACT

KOSTAMAN, T., S. SOPIYANA and A.R. SETIOKO. 2011. Rate of temperature reduction at cryopreservation primordial germ cells (PGC) of three Indonesian native chicken. *JITV* 16(3): 218-223.

Primordial germ cells (PGCs) are original cells of spermatogonia in the testes or oogonia in the ovary. PGCs in poultry can be harvested and stored in the liquid nitrogen and can be used for conservation as genetic materials of poultry. The objective of this study was to obtain the optimal rate of temperature reduction on PGCs quality from three different Indonesian native chicken after thawing. Fertile eggs obtained from native chicken were incubated for 56 hours to obtain embryo at stage of 14-16. PGCs were isolated from the blood using modified Nycodenz Gradient Centrifugation technique. There after they were kept in a straw and equilibrated for 15 minutes at 5°C and frozen at the rate of temperature reduction of 0.3, 0.5, and 1°C per minute using embryo freezing machine (FHK Fujihara: ET-1). After the temperature reached -30°C, then they were plunged directly into the liquid nitrogen. Recovery rate and viability of PGCs after freezing and thawing were measured. The results of this study showed that the average recovery rate of PGCs that have been frozen at rate of temperature reduction of 1, 0.5, and 0.3°C per minute were 35.6, 43.9, and 44.9% respectively. However the rate of temperature reduction of 0.5 and 0.3°C per minute did not significantly affect the recovery rate. The average percentage of viability of PGCs that were frozen at the rate of 1, 0.5 and 0.3°C per minute were respectively 62.6, 77.5, and 77.4%. It seems that the viability followed the trend of recovery rates where the 1°C per minute reduction was the lowest quality compared to the other two treatments. It is concluded that the reduction of 0.5 or 0.3°C per minute are considered as the ideal temperature reduction when native chicken PGCs are frozen.

Key Words: PGCs, Native Chicken, Conservation

ABSTRAK

KOSTAMAN, T., S. SOPIYANA dan A.R. SETIOKO. 2011. Tingkat penurunan suhu pada kriopreservasi *primordial germ cell* (PGC) dari tiga jenis ayam lokal Indonesia. *JITV* 16(3): 218-223.

Primordial germ cell (PGC) adalah sel asli (*original cell*) dari spermatogonia pada testes atau oogonia di *ovary*. PGC pada unggas dapat dipanen dan disimpan di dalam nitrogen cair, sehingga dapat digunakan untuk konservasi materi genetik plasma nutfah unggas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat penurunan suhu yang optimal terhadap kualitas PGC dari tiga jenis ayam lokal Indonesia pascathawing. Telur fertil yang berasal dari tiga jenis ayam lokal diinkubasi selama kurang lebih 56 jam untuk mendapatkan embrio pada tahap 14-16. Selanjutnya dilakukan pemurnian PGC dengan menggunakan metode *Nycodenz Gradient Centrifugation*. PGC disimpan dalam *straw* diekuilibrasikan selama 15 menit pada suhu 5°C dan dibekukan dengan tiga tingkat penurunan suhu yang berbeda 0,3; 0,5; dan 1°C per menit dengan alat pembekuan embrio (FHK Fujihara: ET-1). Setelah sampai pada suhu -30°C, PGC langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Peubah yang diukur meliputi perolehan kembali dan viabilitas PGC pascathawing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata perolehan kembali PGC yang telah dibekukan dengan penurunan suhu 1; 0,5; dan 0,3°C per menit berturut-turut adalah 35,6; 43,9; dan 44,9%. Perolehan kembali PGC yang dibekukan dengan penurunan suhu 1°C per menit lebih rendah dibandingkan dengan penurunan suhu 0,5 dan 0,3°C per menit. Rata-rata viabilitas PGC yang dibekukan dengan penurunan suhu 1; 0,5; dan 0,3°C per menit adalah 62,6; 77,5; dan 77,4%. Tampak bahwa viabilitas PGC juga mengikuti *trend* perolehan kembali, dimana penurunan 1°C per menit memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan dua penurunan suhu lainnya. Dapat disimpulkan bahwa tingkat penurunan suhu 0,5 atau 0,3°C per menit merupakan tingkat penurunan suhu yang ideal untuk digunakan dalam pembekuan PGC pada ayam lokal.

Kata Kunci: PGC, Ayam Lokal, Konservasi

PENDAHULUAN

Laporan dari FAO (2000) menyebutkan bahwa dari 6.379 populasi jenis ternak, 9% pada kondisi kritis dan 39% dalam keadaan hampir punah. Keberadaan

keanekaragaman hayati (biodiversitas) sangat terkait dengan konservasi sumberdaya genetik ternak, namun demikian strategi konservasi yang ada masih belum dilaksanakan dengan baik (SETIOKO, 2008).

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang

berlimpah, termasuk diantaranya adalah jenis-jenis ayam, baik ayam lokal asli Indonesia maupun ayam lokal introduksi yang telah lama beradaptasi di Indonesia. NATAAMIJAYA (2000) melaporkan bahwa diperkirakan terdapat 31 rumpun ayam lokal yang tersebar di Indonesia. Saat ini, kemungkinan sudah sangat sulit untuk mendapatkan koleksi sebanyak itu, karena beberapa rumpun ayam tersebut mungkin hampir punah atau bahkan sudah punah, sehingga perlu upaya konservasi.

Pada unggas, penyimpanan semen beku sebagai bagian dari upaya konservasi sudah banyak dilakukan walaupun hasilnya masih sangat bervariasi, dimana jumlah spema hidup pascathawing hanya mampu mencapai 60% (BLESBOIS dan LABBE, 2003). Sementara itu, penyimpanan ovum dan embrio unggas sulit atau bahkan mustahil dapat dilakukan karena struktur dan ukuran yang besar pada kuning telur (SONG dan SILVERSIDES, 2007).

Melihat permasalahan tersebut, maka bioteknologi reproduksi yang sudah mulai dikembangkan sebagai metode alternatif untuk menyelamatkan material genetik ayam adalah dengan kriopreservasi *primordial germ cell* (PGC). PGC adalah sel-sel bakal kelamin atau leluhur dari spermatogonia dan oogonia. PGC ini bersifat *reversibel* (dapat diubah kembali) yang kelak akan menjadi bentukan sel yang tidak dapat diubah kembali menjadi *full germ cell* ketika berasosiasi dengan sel somatik pada gonad (SHAMBLOTT, 2001).

Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati. Perubahan fisik di dalam sel selama kriopreservasi berkaitan dengan derajat penurunan suhu. Prinsip utama dari derajat penurunan suhu ialah kecepatan optimum yang dapat memberi kesempatan air keluar dari sel secara kontinu bertahap sebagai respon sel terhadap kenaikan konsentrasi larutan ekstraseluler yang semakin tinggi diantara kristal es yang terbentuk. Jika derajat penurunan suhu berlangsung lambat, air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Apabila media pengencer didinginkan di bawah tingkat pendinginan maka kristal es menggumpal dan air akan mengalami pengkristalan keluar sebagai es (WATSON, 2000). Jika derajat penurunan suhu berlangsung cepat, keseimbangan potensial air akan terganggu dan air intraseluler akan membeku. Pada derajat penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang

halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar.

Keberhasilan kriopreservasi PGC unggas telah banyak dilakukan oleh para peneliti sebelumnya, namun persentasi tingkat perolehan kembali PGC masih tergolong rendah. TAJIMA *et al.* (2003) memperoleh persentasi perolehan kembali PGC ayam *White Leghorn* dengan metode filtrasi sebesar 39,4%. SETIOKO *et al.* (2007) melaporkan persentasi perolehan kembali dengan penurunan suhu 1°C per menit pada PGC ayam *White Leghorn* sebesar 49,9%, sedangkan NAKAMURA *et al.* (2007) dengan penurunan suhu yang sama pada ayam *Barred Plymouth Rock* mendapatkan angka perolehan kembali sebesar 54,3%. Pada PGC ayam Kampung, penelitian tentang angka perolehan kembali PGC setelah dibekukan dan *thawing* menggunakan krioprotektan DMSO dengan tingkat penurunan suhu yang berbeda masih belum ada.

Pembekuan embrio sapi umumnya menggunakan penurunan suhu lambat, sedangkan pada sperma sapi umumnya menggunakan penurunan suhu cepat, hal ini terkait dengan ukuran sel yang akan dibekukan. TAPPA *et al.* (2007) melaporkan bahwa diameter spermatozoa pada sapi antara 4,23-7,01 µm, sedangkan GEORGE *et al.* (2003) melaporkan bahwa diameter embrio sapi pada minggu pertama setelah fertilisasi sebesar 1/50 inci atau sekitar 170 µm. Ukuran PGC berada diantara ukuran embrio dan spermatozoa sapi, yaitu antara 14-19 µm (TAGAMI dan KAGAMI, 1997). Untuk itu perlu diketahui tingkat penurunan suhu yang optimal pada proses pembekuan PGC ayam Kampung.

Perkembangan terakhir tentang teknik manipulasi embrio dengan penggunaan transfer PGC ke embrio resipien memungkinkan untuk mendapatkan keturunan yang sehat dari sel *germline* yang dibekukan dan di *thawing* melalui ayam *Chimera* (NAITO *et al.*, 1999, 2001; FURUTA *et al.*, 2001, 2008; PARK *et al.*, 2008; HAN, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2010).

Penelitian dimaksudkan untuk mengetahui tingkat penurunan suhu yang optimal terhadap kualitas PGC dari tiga jenis ayam lokal Indonesia pascathawing dan untuk melakukan koleksi plasmanutfah tiga jenis ayam lokal Indonesia dengan teknologi kriopreservasi.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi, Balai Penelitian Ternak, mulai bulan April sampai Desember 2010. Penelitian ini dilakukan melalui dua tahapan penelitian, yaitu isolasi dan koleksi PGC; kriopreservasi dan pembekuan PGC.

Isolasi dan koleksi PGC

Total 331 butir telur fertil yang berasal dari tiga jenis ayam lokal, yaitu ayam KUB, Arab, dan Sentul diinkubasi pada suhu 38°C selama kurang lebih 56 jam dalam mesin tetas untuk menyiapkan embrio ayam pada tahap 14-16 (HAMBURGER dan HAMILTON, 1951). Telur yang telah diinkubasi kemudian dipecahkan cangkangnya dan seluruh isi telur ditempatkan pada cawan petri dan darah seluruh embrio dikoleksi melalui bagian *aorta dorsalis* menggunakan mikro pipet halus di bawah mikroskop.

Koleksi darah di pool di dalam 1,5 ml tabung mikro yang telah berisi *phosphate buffer saline* [PBS(-)]. Selanjutnya dilakukan pemurnian PGC dengan menggunakan metode *Nycodenz Gradient Centrifugation* yang telah dimodifikasi (ZHAO dan KUWANA, 2003), sehingga didapatkan sel PGC (Gambar 1).



Gambar 1. Sel PGC hasil pemurnian di Laboratorium Reproduksi, Balai Penelitian Ternak. Anak panah hitam adalah sel PGC dan anak panah merah adalah sel darah merah (pembesaran 400x)

Peubah yang diukur meliputi:

1. Persentasi fertilitas: Jumlah telur fertil dibagi jumlah telur yang masuk mesin tetas kali 100%.
2. Persentasi keberhasilan pengumpulan darah embrio: jumlah embrio yang berhasil diambil darahnya dibagi dengan jumlah telur fertil kali 100%.
3. Persentasi keberhasilan pengumpulan darah total: jumlah embrio yang berhasil diambil darahnya secara total dibagi dengan jumlah embrio yang berhasil diambil darahnya.

Kriopreservasi dan pembekuan PGC

Sel PGC ayam dari hasil tahap pertama diencerkan dengan krioprotektan yang mengandung 10% DMSO dalam FBS. Selanjutnya PGC dikemas menggunakan

straw 0,5 ml dan setiap *straw* berisi 50 sel PGC. PGC yang ada di dalam *straw* diekuilibrasi selama 15 menit pada suhu 5°C, dan dimasukkan dalam alat pembekuan embrio (merk FHK Fujihira: ET-1), dimana sebelumnya alat tersebut telah diatur pada tiga tingkat penurunan suhu, yaitu 0,3; 0,5 dan 1°C per menit. Setelah suhu mencapai -7°C, *seeding* dilakukan dengan cara menekan dengan pinset yang telah dicelupkan ke dalam nitrogen cair agar keseluruhan isi *straw* membeku. Setelah itu, *straw* dimasukkan kembali ke dalam alat pembekuan sampai suhu -30°C, kemudian langsung dimasukkan ke dalam tangki nitrogen cair. Setelah satu minggu, sample di *thawing* dengan memasukkan *straw* ke dalam pemanas air suhu 39°C sampai mencair. Sample dikeluarkan dari *straw* kemudian dimasukkan ke dalam *ependorf* dan ditambahkan 1000 ul PBS-FBS lalu di sentrifus selama 7 menit, sebanyak dua kali. Jumlah PGC setelah *thawing* dihitung menggunakan mikroskop. Peubah yang diukur meliputi:

1. Perolehan kembali PGC: yaitu jumlah PGC^s setelah *thawing* dibagi dengan jumlah PGC sebelum pembekuan kali 100%.
2. Viabilitas PGC setelah *thawing*: yaitu jumlah PGC hidup setelah *thawing* dibagi dengan jumlah PGC setelah *thawing* kali 100%.

Data isolasi dan koleksi PGC dianalisis secara deskriptif, sedangkan untuk data perolehan kembali dan viabilitas PGC pascathawing dianalisis menggunakan rancangan faktorial dengan bantuan program SPSS versi 17, dimana faktor A (perlakuan) adalah tiga jenis ayam dan faktor B adalah tiga tingkat penurunan suhu dengan ulangan sebanyak 10 kali. Jika hasil analisis menunjukkan interaksi signifikan, maka dilanjutkan dengan dibandingkan nilai tengah perlakuan dalam masing-masing jenis ayam dan tingkat penurunan suhu pembekuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan koleksi PGC

Persentasi fertilitas telur ayam yang digunakan dalam penelitian ini relatif rendah hanya sekitar 47,6% pada ayam KUB, dan 48,5% ayam Sentul, sedangkan untuk ayam Arab lebih tinggi yaitu mencapai 84,1% (Tabel 1). Tingginya fertilitas telur ayam Arab disebabkan telur-telur yang diperoleh berasal dari hasil kawin alam, sedangkan untuk ayam KUB dan Sentul telur berasal dari hasil IB.

Rata-rata persentasi tingkat keberhasilan pengumpulan darah embrio pada tiga jenis ayam lokal bervariasi dari 81,3-87,9%. Ada dua faktor yang menentukan tingkat keberhasilan pengumpulan darah embrio, yaitu tahap perkembangan embrio dan kondisi jarum untuk mengambil darah. Tahap perkembangan

Tabel 1. Persentasi fertilitas, persentasi tingkat keberhasilan pengumpulan darah embrio, jumlah PGC per embrio dan keberhasilan pemanenan PGC pada tiga jenis ayam lokal

Jenis ayam	Jumlah telur awal (butir)	Jumlah telur fertil (butir)	Fertilitas (%)	Keberhasilan pengumpulan darah embrio (%)	Keberhasilan pemanenan PGC (%)
KUB	235	106	47,6±16,8	85,0±8,3	82,9±4,7
Arab	179	157	84,1±14,3	87,9±7,9	84,0±5,5
Sentul	150	68	48,5±15,3	81,3±8,8	80,5±4,9

embrio di bawah 13, pembuluh darahnya sangat tipis sehingga mudah sekali robek bila penanganannya kurang baik. Disisi lain, bila tahap perkembangan embrio sudah mencapai di atas 18, maka pembuluh darah sudah menebal, sehingga kadang-kadang sulit untuk ditembus dengan jarum. NAKAMURA *et al.* (2007) melaporkan bahwa jumlah PGC terbanyak di sirkulasi darah, yaitu 67-73 sel ada pada tahap 15. Sementara itu, SETIOKO *et al.* (2010) mendapatkan PGC pada sirkulasi darah ayam lokal sebanyak 15-29 sel.

Keberhasilan pemanenan PGC ditentukan oleh kemampuan operator, ketersediaan dan kondisi peralatan yang digunakan. Rata-rata persentasi tingkat keberhasilan pemanenan PGC pada tiga jenis ayam lokal relatif tinggi, yaitu antara 80,5-84,0%.

Kriopreservasi dan pembekuan PGC

Rataan persentasi perolehan kembali (*recovery rate*) PGC yang telah dibekukan dengan menggunakan DMSO sebagai krioprotektan dengan tingkat penurunan suhu 1, 0,5 dan 0,3°C pascathawing berturut-turut adalah 35,6; 43,9 dan 44,9%. Pembekuan pada tingkat penurunan suhu 1°C per menit secara nyata lebih rendah dibandingkan dengan tingkat penurunan suhu 0,3 dan 0,5°C per menit. Sementara itu, persentasi perolehan kembali PGC antara ayam KUB, Arab dan Sentul berbeda nyata, yaitu masing-masing 45,0; 39,3 dan 42,3%. Tidak ada pengaruh interaksi antara tingkat penurunan suhu dan jenis ayam (Tabel 2). Akan tetapi rata-rata persentasi perolehan kembali PGC pascathawing untuk ayam lokal pada penelitian ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan perolehan kembali 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%.

Persentasi perolehan kembali PGC yang dibekukan dengan tingkat penurunan suhu 1°C lebih rendah dibandingkan dengan tingkat penurunan suhu 0,5 dan 0,3°C. Hal ini kemungkinan disebabkan tingkat penurunan suhu 1°C per menit umumnya dilakukan untuk membekukan embrio sapi, dimana ukuran embrio sapi jauh lebih besar dibandingkan dengan PGC. Selain itu, dengan tingkat penurunan suhu 1°C per menit dapat menyebabkan proses pembentukan kristal es yang lebih

cepat dan secara fisik akan mendesak membran sel ke segala arah. Konsekuensinya selaput membrannya pecah dan substansi kimia PGC keluar, yang pada gilirannya akan berpengaruh terhadap perolehan kembali PGC pascathawing. Sebaliknya dengan tingkat penurunan suhu 0,5 atau 0,3°C per menit dapat meminimalkan pembentukan kristal es. Namun demikian tingkat penurunan suhu 0,5 dan 0,3°C per menit tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Rata-rata persentasi viabilitas PGC yang telah dibekukan dengan tingkat penurunan suhu 1; 0,5 dan 0,3°C per menit pascathawing pada tiga jenis ayam lokal berturut-turut adalah 62,6; 77,5 dan 77,4% (Tabel 3). Tingkat penurunan suhu 1°C per menit secara nyata lebih rendah dibandingkan dengan tingkat penurunan suhu 0,3 dan 0,5°C per menit. Sementara itu, persentasi viabilitas antara ayam KUB, Arab dan Sentul tidak berbeda nyata, yaitu masing-masing 73,1; 72,4 dan 72,0%. Tidak ada pengaruh interaksi antara tingkat penurunan suhu dan jenis ayam. Rataan persentasi viabilitas PGC hasil penelitian yang diperoleh sedikit lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya, yaitu 83,5% (SETIOKO *et al.*, 2007) dan 85,7% (NAKAMURA *et al.*, 2011).

Tidak ada perbedaan yang nyata pada nilai persentasi viabilitas PGC ayam Kampung, Arab maupun Sentul. Hasil yang sama dilaporkan oleh NAKAMURA *et al.* (2011) bahwa persentasi viabilitas PGC tidak dipengaruhi oleh jenis atau bangsa ternak.

Seperti halnya pada persentasi nilai perolehan kembali, persentasi viabilitas PGC yang dibekukan dengan tingkat penurunan suhu 1°C lebih rendah dibandingkan dengan tingkat penurunan suhu 0,5 dan 0,3°C per menit. Nampak bahwa persentasi viabilitas PGC selaras dengan persentasi perolehan kembali, dimana tingkat penurunan suhu 1°C memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan dua penurunan suhu lainnya.

Nilai persentasi perolehan kembali dan viabilitas PGC pada penelitian ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan oleh para peneliti sebelumnya. Hal ini disebabkan oleh faktor perbedaan konsentrasi sel, di mana pada penelitian ini jumlah PGC yang dibekukan

Tabel 2. Rataan persentasi perolehan kembali PGC dengan tiga tingkat penurunan suhu setelah *freezing* dan *thawing*

Jenis ayam	Penurunan suhu			Rataan
	1 ^o /menit	0,5 ^o /menit	0,3 ^o /menit	
Ayam KUB (n=10)	39,6±4,7	45,7±3,2	49,7±3,9	45,0 ^c ±4,0
Ayam Arab (n=10)	33,9±4,3	40,4±5,9	43,5±1,9	39,3 ^a ±4,0
Ayam Sentul (n=10)	35,9±5,9	45,7±3,0	44,3±3,7	42,3 ^b ±4,2
Rataan	35,6 ^a ±5,4	43,9 ^b ±4,5	44,9 ^b ±3,2	

Rataan pada kolom dan lajur yang sama dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

Tabel 3. Rataan persentasi viabilitas PGC dengan tiga tingkat penurunan suhu setelah *freezing* dan *thawing* pada tiga jenis ayam lokal

Jenis ayam	Penurunan suhu			Rataan
	1 ^o /menit	0,5 ^o /menit	0,3 ^o /menit	
Ayam KUB (n=10)	63,9±3,0	78,5±5,6	77,1±3,7	73,1 ^a ±4,1
Ayam Arab (n=10)	62,9±7,4	75,2±3,7	79,1±2,6	72,4 ^a ±4,6
Ayam Sentul (n=10)	59,2±10,4	78,8±4,3	76,0±3,8	72,0 ^a ±6,2
Rataan	62,6 ^a ±5,5	77,5 ^b ±4,5	77,4 ^b ±3,7	

Rataan pada kolom dan lajur yang sama dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$)

hanya 50 sel, sedangkan SETIOKO *et al.* (2007) dan NAKAMURA *et al.* (2011) konsentrasi sel yang dibekukan sebanyak 100. Selain itu, pada penelitian ini PGC yang dibekukan menggunakan kemasan *straw* 0,5 ml, sedangkan pada penelitian yang lain PGC yang dibekukan menggunakan *cryotubes*. Menurut MOHAMAD *et al.* (2005) dengan menggunakan kemasan *straw* 0,5 ml dapat meningkatkan volume larutan dan barrier antara larutan dengan nitrogen cair sehingga mengurangi kecepatan penurunan suhu dan kecepatan pencairan kembali.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pembekuan PGC pada ayam lokal yang terbaik dilakukan dengan tingkat penurunan suhu 0,5 atau 0,3°C per menit. Hal ini dapat terlihat dengan persentasi perolehan kembali dan viabilitas PGC yang lebih tinggi dibandingkan dengan 1°C per menit, berturut-turut untuk persentasi perolehan kembali adalah 35,6 (1°C); 43,9 (0,5°C) dan 42,8% (0,3°C) dan untuk viabilitas berturut-turut adalah 62,9 (1°C); 77,5 (0,5°C) dan 77,4% (0,3°C). Implikasi dari penelitian ini adalah konservasi plasma nutfah unggas lokal dapat dilakukan, sehingga kelak dapat dimanfaatkan kembali untuk tujuan pembibitan unggas di waktu mendatang.

DAFTAR PUSTAKA

- BLESBOIS, E. and C. LABBE. 2003. Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. *In: Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*, Paris 2003. pp. 55-65.
- FAO. 2000. World Watch List for Domestic Animal Diversity. 3rd Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FURUTA, H., K. KINOSHITA, Y. MAEDA and N. FUJIHARA. 2001. Restoration of genetic resources from Ehime native chicken via transferred Primordial Germ Cells (PGCs). *J. Poult. Sci.* 38: 302-307.
- FURUTA, H., T. SAWADA, K. NISHIKAWA, I. YAMAMOTO, T. YOSHIDA and M. TANAKA. 2008. Transfer of blood containing primordial germ cells between chicken eggs development of embryonic reproductive tract. *Cytotechnology* 56: 27-32.
- GEORGE, E., SEIDL JR., R.P. ELSDEN and J.F. HASLER. 2003. Embryo Transfer in Dairy Cattle. W.D Howard and Sons Company Book Department. P.O. Box 801 Fort Atkinson, W.I. 53538-0801 USA. pp. 96.
- HAMBURGER, V. and H.L. HAMILTON. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.

- HAN, J.Y. 2009. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comm. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 61-80.
- MOHAMAD, K., I. DJUWITA, A. BOEDIONO dan I. SUPRIATNA. 2005. Vitifikasi ovarium menciit menggunakan etilen glikol dan DMSO sebagai krioprotektan dan viabilitasnya pasca-autotransplantasi di subkapsula ginjal. *Media Kedok. Hewan* 21: 23-27.
- NAITO, M., A. SANO, Y. MATSUBARA, T. HARUMI, T. TAGAMI, M. SAKURAI and T. KUWANA. 2001. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads. *Reproduction* 121: 547-552.
- NAITO, M., Y. MATSUBARA, T. HARUMI, T. TAGAMI, H. KAGAMI, M. SAKURAI and T. KUWANA. 1999. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J. Reprod. Fertil.* 117: 291-298.
- NAKAMURA, Y., F. USUI, D. MIYAHARA, T. MORI, H. WATANABE, T. ONO, K. TAKEDA, K. NIRASAWA, H. KAGAMI and T. TAGAMI. 2011. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chicken. *J. Poult. Sci.* 48: 57-63.
- NAKAMURA, Y., F. USUI, T. ONO, K. TAKEDA, K. NIRASAWA, H. KAGAMI and T. TAGAMI. 2010. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod.* 83: 130-137.
- NAKAMURA, Y., Y. YAMATO, F. USUI, T. MUSHIKA, T. ONO, A.R. SETIOKO, K. TAKEDA, K. NIRASAWA, H. KAGAMI and T. TAGAMI. 2007. The migration and proliferation of primordial germ cells in early embryo of the chicken. *Poult. Sci.* 86: 2182-2193.
- NATAAMIJAYA, A.G. 2000. Ayam kampung Indonesia. *Bull. Plasma Nufah* 6: 1-6.
- PARK, T.S., M.A. KIM, J.M. LIM and J.Y. HAN. 2008. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras derived from *in vitro*-cultured gonadal primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75: 274-281.
- SETIOKO, A.R. 2008. Konservasi plasmanutfah unggas melalui kriopreservasi primordial germ cells (PGC). *Wartazoa* 18: 68-77.
- SETIOKO, A.R., T. KOSTAMAN dan S. SOPIYANA. 2010. Jumlah *primordial germ cells* (PGC) pada beberapa tingkat umur embrio yang berbeda pada ayam buras dan ras. Pros. Seminar Nasional Biologi. Jatinangor, Bandung 6 Desember 2010. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Padjajaran. Bandung. hlm. 133-141.
- SETIOKO, A.R., T. TAGAMI, H. TASE, Y. NAKAMURA, K. TAKEDA and K. NIRASAWA. 2007. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs) from White Leghorn using commercial cryoprotectants. *J. Poult. Sci.* 44: 73-77.
- SHAMBLOTT, M.J. 2001. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 98:113-118.
- SONG, Y. and F.G. SILVERSIDES. 2007. Production of offspring from cryopreserved chicken testicular tissue. *Poult. Sci.* 86: 1390-1396.
- TAGAMI, T. and H. KAGAMI. 1997. Developmental origin of avian primordial germ cells and it's unique differentiation in the gonads of mixed-sex chimeras. *Mol. Reprod. Dev.* 50: 370-376.
- TAJIMA, A., G.F. BARBATO, T. KUWANA and R.H. HAMMERSTEDT. 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.
- TAPPA, B., F. AFIATI dan S. SAID. 2007. Identifikasi kepala spermatozoa kerbau, sapi dan domba secara morfometri. *J. Protein* 15: 159-165.
- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- ZHAO, D.F. and T. KUWANA. 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci.* 44: 30-35.