

## **PENGARUH PERBEDAAN WAKTU KOLEKSI SEL BLASTODERM TERHADAP PERKEMBANGAN PASCA INOKULASI PADA EMBRIO AYAM KEDU**

*(Effect Of Different Time Blastoderm-Cell Collection On Growth And Survival Development Embryo Post Inoculation Of Kedu Chicken)*

**Y. S. Ondho, S. Johari, G. G. W. Nugroho**

Laboratorium Ilmu Pemuliaan dan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan, UNDIP

### **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui waktu yang terbaik koleksi sel blastoderm terhadap perkembangan embrio pasca inokulasi. Materi penelitian terdiri dari 30 butir telur ayam Kedu Hitam "unfertilized", 30 butir telur ayam Kedu Putih "unfertilized", 15 butir telur fertil ayam Kedu Hitam dan 15 butir telur fertil ayam Kedu Putih. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial 5 x 2. faktor I adalah waktu koleksi sel blastoderm dan faktor II adalah jenis telur ayam Kedu. Variabel yang diamati adalah fertilitas telur dan perkembangan embrio. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase fertilitas telur ayam Kedu Hitam secara berurutan dari yang tertinggi adalah perlakuan jam ke-4 (J<sub>5</sub>) (66,7%), jam ke-2 (J<sub>3</sub>) (33,3%), jam ke-0 (J<sub>1</sub>) (33,3%), jam ke-3 (J<sub>4</sub>) (16,7%), dan jam ke-4 (J<sub>5</sub>) (16,7%). Persentase fertilitas telur ayam Kedu Putih secara berurutan dari yang tertinggi adalah perlakuan J<sub>5</sub>(66,7%), J<sub>1</sub>(33,3%), J<sub>2</sub>(16,7%), J<sub>3</sub>(16,7%), dan J<sub>4</sub>(16,7%). Perkembangan embrio terbaik terjadi pada perlakuan J<sub>2</sub> pada telur ayam Kedu Hitam dan J<sub>3</sub> telur ayam Kedu Putih, karena saat itu sel-sel blastoderm masih mengalami proses perbanyakan sehingga memungkinkan perkembangan sel menuju tahap selanjutnya (morula, gastrula) menjadi lebih lancar.

Kata kunci : waktu koleksi, sel blastoderm, inokulasi, fertilitas.

### **ABSTRACT**

The objectives of this research was to evaluate best time collection of blastoderm-cell and survival embryo-foetus development post-inoculation. The research, were required 30 unfertilized eggs Kedu Hitam and 30 unfertilized eggs Kedu Putih as recipient blastoderm-cell, for donors of blastoderm-cell using 15 fertilized eggs Kedu Hitam and 15 fertilized Kedu Putih. This research analysis by Factorial 5 x 2 with Completely Randomized Design. Main factor was time blastoderm-cell collection and species Kedu native chicken of the secondary factor (color basic). Parameters observed in this research were eggs fertility and growth of embryo-foetus post inoculation. The result showed that all eggs post inoculation blastoderm-cell expanded to formed the foetus. The time eggs collected on 2 – 3 hours after oviposition caused the best survival on embryo-foetus development.

Key words : time collection, blastoderm-cell, inoculation, eggs fertility.

## PENDAHULUAN

Rekayasa genetik dengan teknik inokulasi sel dapat digunakan dalam upaya perbaikan mutu ternak, pada saat ini telah dilakukan sekalipun baru sebatas kegiatan eksperimen. Material inokulan berupa sel-sel blastoderm dapat diperoleh pada telur ayam yang sedang dieram. Keuntungan-keuntungan yang diharapkan dalam pemanfaatan teknik kultur sel blastoderm adalah: (1) meningkatkan kinerja teknik untuk keperluan pemuliaan ternak khususnya unggas (2) pengenalan sel dan jaringan yang mengandung komponen sifat-sifat gen yang unggul. Sampai saat ini percobaan-percobaan kultur sel blastoderm pada unggas masih mengalami kendala, terutama dalam hal menentukan waktu yang terbaik dalam koleksi sel blastoderm, sehingga sering ditemui penurunan fertilitas telur pasca-inokulasi sel blastoderm. Hal ini terkait dengan antara lain teknik isolasi atau penanganan kultur sel blastoderm tersebut.

Proses inokulasi sel blastoderm pada telur unggas memerlukan pelubangan cangkang telur. Petite *et al.*, (1990) dan Bosselman *et al.*, (1989) menggunakan alat bor untuk melubangi cangkang dengan diameter 5-8 mm. Membran telur kemudian dipotong dengan pisau bedah. Sebanyak 2-10  $\mu$ l sel blastoderm diinjeksikan ke sub germinal telur resipien. Lubang kemudian ditutup dengan membran telur segar kemudian cangkang ditutup dengan gib. Thoraval *et al.*, (1995) melubangi cangkang dengan bentuk segitiga, kemudian menginjeksikan blastoderm sebanyak 10  $\mu$ l, kemudian menutup telur dengan menggantikan cangkang yang direkatkan dengan isolatif. Perlakuan waktu koleksi sel blastoderm akan berpengaruh terhadap perkembangan embrio, waktu koleksi sel blastoderm lebih cepat akan menghasilkan perkembangan embrio lebih baik.

Teknik pelubangan menurut Bosselman *et al.*, (1989), telur segar dibersihkan dengan

ethanol 70%, dan diletakkan dengan horizontal untuk beberapa jam. Pelubangan dengan cara mengebor cangkang dengan diameter 5 mm dari ujung horizontal telur menggunakan mini bor dengan mata bor 1 mm, tanpa merusak membran telur. Membran kemudian dipotong dengan menggunakan pisau bedah tanpa meninggalkan tepi yang bergerigi. Blastoderm ditempatkan (diinokulasikan) dengan mikropipet 200  $\mu$ l. Sebanyak 5  $\mu$ l sel blastoderm (terdapat 500 sampai 1000 sel) disuntikan kedalam sub germinal telur resipien. Lubang ditutup dengan menggunakan membran segar kira-kira 1 cm<sup>2</sup> dan setelah mengeringkan ditutup dengan petih telur. Telur dimasukkan kedalam mesin penetas pada 39,5<sup>o</sup> C dengan kelembaban 68% dan diputar 90<sup>o</sup> setiap 8 jam selama 18 hari. Telur kemudian ditempatkan kedalam keranjang penetasan dengan suhu 39<sup>o</sup> C dengan kelembaban 70% sampai menetas.

### Perumusan Masalah

Untuk membentuk ternak bibit (ayam) diperlukan teknologi perkembangbiakan secara cepat dengan teknik transfer blastoderm. Keberhasilan pertumbuhan embrio pasca inokulasi sel blastoderm pada telur ayam antara lain ditentukan oleh kualitas sel blastoderm yang akan diinokulasikan, ketepatan waktu pengambilan (koleksi) sel blastoderm dari telur pendonor. Sel-sel blastomer yang masih dalam keadaan segar memberikan efek tumbuh yang baik pada saat setelah diinokulasikan, oleh sebab itu perlu dijaga agar sel-sel blastomer masih mempunyai kondisi yang tetap bagus. Pemandahan (inokulasi) material genetik (terdapat dalam sel blastomer) kedalam embrio yang sedang berkembang sebelum mengalami deferensiasi sel. Introduksi material genetik ke dalam embrio dapat dilakukan sedini mungkin sebelum ditelurkan pada unggas atau segera setelah proses peneluran (oviposisi). Proses transgenik pada unggas akan lebih mudah dilakukan setelah embrio unggas ditelurkan (oviposisi) dengan melakukan pelubangan cangkang telur untuk

proses inokulasi sel blastodermnya. Dengan cara ini dapat dilakukan untuk pengembangan teknologi memperbanyak bibit ayam dengan cepat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu yang terbaik dalam koleksi sel blastoderm terhadap perkembangan embrio (fase-fase pembelahan sel blastoderm) pasca inokulasi. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dan informasi tentang waktu yang terbaik dalam koleksi sel blastoderm, dapat mengetahui perkembangan embrio (fase-fase pembelahan sel blastoderm), dan mengetahui angka kematian pada perkembangan embrio dengan metode sederhana, sehingga dapat digunakan untuk mengembangbiakkan ternak dengan cepat, mudah dan murah.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan Juli sampai dengan akhir bulan September 2008 di Unit Pelaksana Teknis (UPT) Balai Pembibitan Ternak Satuan Kerja Maron di Maron, Temanggung. Materi penelitian terdiri dari 30 butir telur ayam Kedu Hitam "unfertilized", 30 butir telur ayam Kedu Putih (PP) "unfertilized", kemudian 30 butir telur ayam kedu (fertil) sebagai donor yang terdiri dari 15 butir telur ayam Kedu Hitam (HH) dan 15 butir telur ayam Kedu Putih (PP). Peralatan yang digunakan meliputi "eggs candler" (teropong telur), "work chamber modified" yang dibuat steril ukuran 0,8 x 0,5 x 0,5 m, sterilisator, mikropipet kapasitas sampai dengan 200 µl, mini bor 1 mm, timbangan elektrik, dan mesin tetas kapasitas 100 butir. Bahan penelitian terdiri dari patahan kerabang telur, membran telur, alkohol 70 %, tissue dan disinfektan.

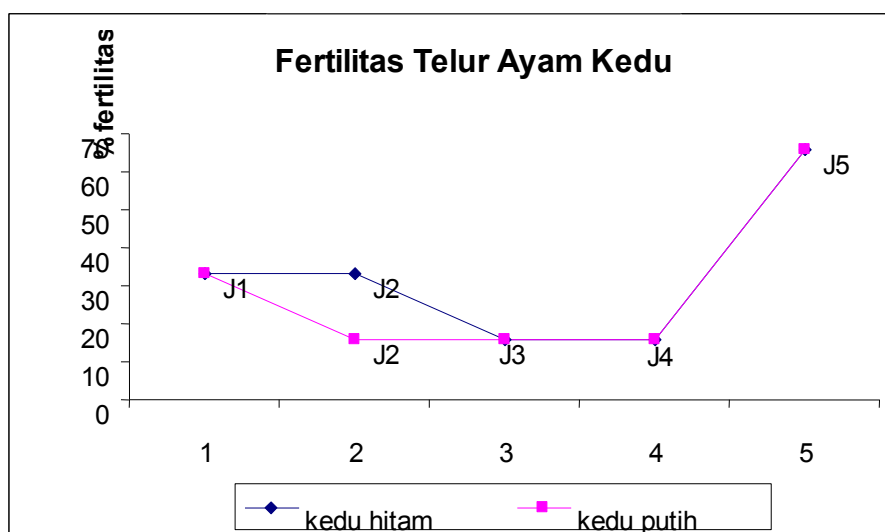
### Metoda Penelitian

Telur ayam Kedu yang terpilih sebagai materi penelitian (telur donor dan resipien) dibersihkan kulitnya terlebih dahulu, telur

resipien dilubangi kulitnya (diameter pelungan 1.5 mm) dengan menggunakan minibor dan telur donor dikoleksi blastodermnya yang berlokasi disekitar yolk (kuning telur). Teknik koleksi sel blastoderm dilakukan dengan cara membuka cangkang telur donor, kemudian isi telur di masukkan kedalam cawan petri. Sel blastoderm terlihat berupa bintik-bintik putih di tengah kuning telur. Mikro pipet 200 µl digunakan untuk menghisap sel blastoderm dari kuning telur sebanyak 10µl. Blastoderm yang diperoleh kemudian di-inokulasikan kedalam telur resipien. Inokulasi dilakukan dengan mengambil 10 µl sel-sel blastoderm menggunakan pipet lalu dipindahkan kedalam telur resipien melalui lubang yang telah dibuat. Inokulasi sel blastoderm dilakukan dengan cara menginjeksi ke dalam *subgerminal* telur resipien menggunakan spuit kapasitas 1 ml. Permukaan lubang pada telur resipien kemudian dilapisi dengan membran telur yang telah dipersiapkan dan ditutup dengan patahan kerabang telur. Agar supaya dapat menempel dengan rapat, kerabang telur bagian dalam di olesi putih telur secukupnya. Telur-telur resipien kemudian dieramkan dalam incubator (mesin tetas), teknik penetasan mendasarkan pada prosedur baku penetasan.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial 5 x 2 kombinasi perlakuan. Setiap kombinasi perlakuan dilakukan 6 kali ulangan. Faktor I adalah waktu koleksi sel blastoderm 5 perlakuan, yaitu pada jam ke-0 (J<sub>1</sub>), jam ke-1 (J<sub>2</sub>), jam ke-2 (J<sub>3</sub>), jam ke-3 (J<sub>4</sub>), dan jam ke-4 (J<sub>5</sub>) setelah oviposisi. Faktor II adalah jenis telur ayam Kedu dengan 2 taraf, yaitu telur ayam Kedu Hitam, telur ayam Kedu Putih. Variabel yang diamati adalah persentase fertilitas dan kemampuan embrio dalam bertahan hidup.



Ilustrasi 1. Persentase Fertilitas Telur Ayam Kedu Hitam Hitam dan Kedu Putih.

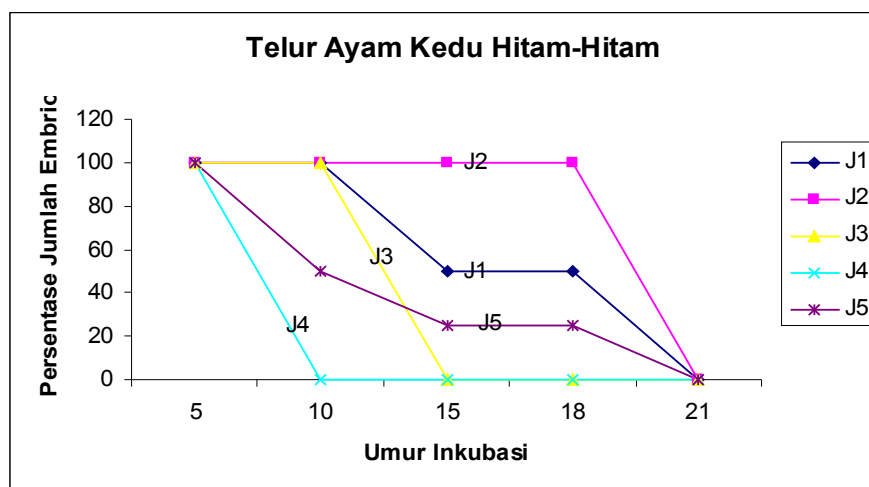
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Fertilitas

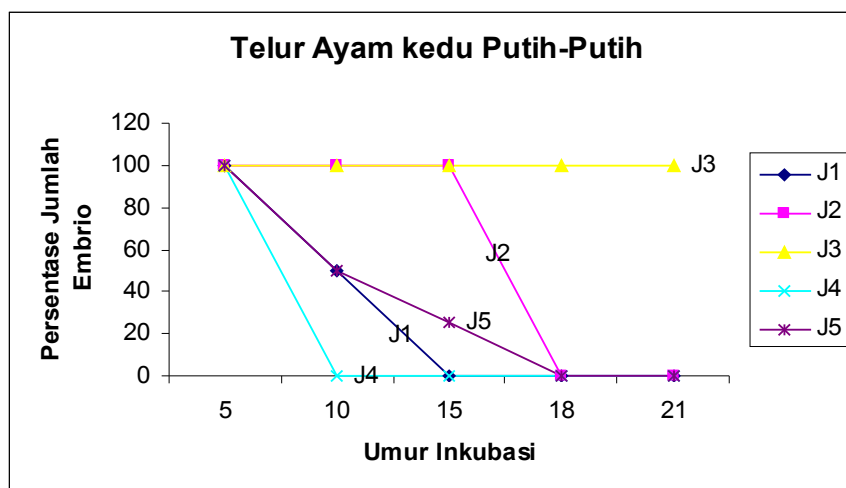
Fertilitas telur ayam Kedu Hitam dan Kedu Putih pada setiap perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ). Fertilitas pada ayam Kedu Hitam untuk masing-masing perlakuan adalah  $J_1$  (33,3%),  $J_2$  (33,3%),  $J_3$  (16,7%),  $J_4$  (16,7%) dan  $J_5$  (66,7%), sedangkan fertilitas telur ayam Kedu Putih pada setiap perlakuan adalah  $J_1$  (33,3%),  $J_2$  (16,7%),  $J_3$  (16,7%),  $J_4$  (16,7%) dan  $J_5$  (66,7%), fertilitas telur dapat dilihat

pada Ilustrasi 1.

Dengan demikian baik pada telur Ayam Kedu Hitam dan telur Ayam Kedu Putih sama-sama mempunyai fertilitas yang cukup baik. Hasil pengamatan visual terhadap contoh telur-telur tersebut sedang pada fase pembentukan hypoblast, dan terjadi perkembangan area blastoderm yang akan berkembang menjadi *primitive streak* setelah 6 jam dalam inkubasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Pettite (1990), yang menjelaskan bahwa setelah proses inkubasi 4-5 jam maka proses selanjutnya adalah sel-sel blastoderm melakukan gerakan ke bagian dalam,



Ilustrasi 2. Grafik Persentase Perkembangan Embrio Telur Ayam Kedu Hitam



Ilustrasi 3. Grafik Persentase Perkembangan Embrio Telur Ayam Kedu Putih

menyusun diri membentuk lapisan mesoderm sehingga embrio ayam terdiri dari 3 lapisan germinal yaitu : ekoderm, mesoderm dan endoderm. Lebih lanjut dijelaskan Smith (1997), bahwa pembentukan *primitive streak* terjadi pada telur yang telah diinkubasi selama lebih dari 6 jam, *primitive streak* terdiri dari 3 lapis sel yaitu ektoderm paling luar, mesoderm di tengah-tengah, dan endoderm di sebelah dalam yang nantinya akan menjadi bagian kaudal embrio. Lebih lanjut dijelaskan juga oleh Eyal-Giladi (1991), yang mengatakan bahwa lapisan *primitive* merupakan penebalan dari ektoderm. Tidak lama lagi, pada jam ke-21 terbentuk sepasang bagian yang menjadi mesoderm. Lapisan mesoderm merupakan bagian perkembangan embrio, pada jam ke-24 berkembang menjadi 5 lapisan dan seterusnya jam ke-25 menjadi 7 lapis, dan jam ke-38 terdapat 17 lapis.

### Perkembangan Embrio-Foetus

Perkembangan embrio menjadi foetus pada telur ayam berawal dengan munculnya bercak darah pada kuning telur. Pada penelitian ini, perkembangan embrio menjadi foetus diamati secara kontinyu pada seluruh perlakuan (J<sub>1</sub> J<sub>2</sub> J<sub>3</sub> J<sub>4</sub> dan J<sub>5</sub>) pada umur inkubasi 0-21 hari, grafik persentase

perkembangannya (ayam Kedu Hitam dan Kedu Putih) seperti diperlihatkan pada Ilustrasi 2 dan 3.

Perkembangan embrio menjadi foetus yang diamati setiap periode pada J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>4</sub>, dan J<sub>5</sub> pada jenis telur ayam Kedu Hitam dan jenis telur ayam Kedu Putih menunjukkan perkembangan yang sama pada umur inkubasi 5 hari. Jumlah embrio dari telur fertil pada setiap jenis telur dan perlakuan mampu bertahan 100% hidup.

Pengamatan pada umur 10 hari penetasan perlakuan J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> dan J<sub>3</sub> pada jenis telur ayam Kedu Hitam menunjukkan perkembangan embrio menjadi foetus dari telur fertil mampu hidup dan berkembang sebesar 100%. Pada perlakuan J<sub>2</sub> dan J<sub>3</sub> jenis telur ayam Kedu Putih juga menunjukkan perkembangan yang sama. Pertumbuhan embrio pada perlakuan J<sub>1</sub> dan J<sub>5</sub> jenis telur ayam Kedu Putih hanya sebesar 50%. Pertumbuhan embrio pada perlakuan J<sub>5</sub> jenis telur ayam Kedu Hitam sebesar 50%. Persentase jumlah foetus yang berkembang sampai hari ke-15 masih sangat bagus, terjadi pada perlakuan J<sub>2</sub> jenis telur ayam Kedu Hitam sebesar 100% dari telur fertil, hal ini terjadi juga pada perlakuan J<sub>2</sub> dan J<sub>3</sub> jenis telur ayam Kedu Putih.

Kematian foetus yang terjadi pada umur

inkubasi sampai 15 hari, yaitu pada perlakuan J<sub>3</sub> dan J<sub>4</sub> dari jenis telur ayam Kedu Hitam sehingga yang masih bertahan hidup adalah J<sub>1</sub> (50%), J<sub>2</sub>(100%) dan J<sub>5</sub> (25%), sedangkan pada jenis telur ayam Kedu Putih persentase foetus yang tumbuh dan bertahan hidup sampai hari ke-15 terjadi pada perlakuan J<sub>2</sub> (100%), J<sub>3</sub> (100%), dan J<sub>5</sub> (25%). Pengamatan umur inkubasi sampai hari ke-18 foetus yang berasal dari telur ayam Kedu Hitam untuk semua perlakuan tidak mengalami perubahan sejak hari ke-15 yaitu persentase foetus dari telur fertil pada perlakuan J<sub>1</sub> (50%), J<sub>2</sub> (100%), dan J<sub>5</sub> (25%). Pada foetus dari telur ayam Kedu Putih perlakuan J<sub>2</sub> dan J<sub>5</sub> mengalami kematian, sehingga jumlah dari telur fertil yang mampu bertahan sampai hari ke- 18 hanyalah perlakuan J<sub>2</sub> dan J<sub>5</sub>. Jenis telur ayam Kedu Hitam tidak ada yang menetas, sedangkan telur yang menetas pada jenis telur ayam Kedu Putih hanya terjadi pada perlakuan J<sub>3</sub> dan hanya mampu hidup selama 2 hari, hal ini diduga karena kekurangan cadangan makanan dari dalam tubuhnya.

Persentase perkembangan embrio yang paling baik terjadi pada perlakuan J<sub>2</sub> pada telur ayam Kedu Hitam dan J<sub>3</sub> telur ayam Kedu Putih, karena sel-sel embrio saat itu masih mengalami perkembangan, sehingga perkembangan sel menuju tahap gastrula akan lebih mudah berkembang dengan baik. Lebih lanjut dijelaskan Dupuy *et al.*, (2002), yang mengatakan bahwa telur yang baru keluar dari kloaka (oviposisi) masuk pada fase pembentukan hypoblast. Pembentukan hypoblast dimulai dari sisi area pellucida. Hypoblast berkembang ke arah bagian depan dan menutup setengah bagian posterior area pellucida kecuali zone marginal. Blastoderm terbagi menjadi dua lapisan, lapisan atas disebut epiblast membentuk bagian belakang embrio, sedangkan bagian bawah disebut hypoblast yang dapat menutup bagian tengah area pellucida. Lebih lanjut juga dijelaskan oleh Pettite (1990), bahwa perubahan blastula menjadi glastula terjadi 1 jam setelah telur

dikeluarkan dari kloaka selanjtnya pada telur yang telah diinkubasi 3-4 jam 1/3 bagian dari area pelusida mengalami penebalan. Eyal-Giladi (1991), menjelaskan bahwa selama proses inkubasi 1-6 jam terjadi penebalan di area blastoderm dan pada jam 7-12 jam inkubasi sudah mulai terbentuk *primitive steak* yang menjadi bakal individu baru (foetus).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Waktu koleksi sel blastoderm yang lebih cepat dari telur ayam Kedu Hitam maupun telur ayam Kedu Putih mengakibatkan perkembangan embrio lebih baik. Telur yang terbaik sebagai sumber sel blastoderm dan masih tetap bagus untuk diinokulasikan adalah telur yang dikoleksi 2 sampai 3 jam setelah oviposisi.

### Saran

Mempertahankan kemampuan hidup atau menghindari terjadinya kematian embrio dini dapat dikurangi dengan cara menyediakan ruangan yang lebih bersih, ruang kerja menjadi lebih steril.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bosselman, R. A., R.-Y. Hsu, T. Boggs, S. Hu, J. Bruszewski, S. Ou, L. Souza, L. Kozar, F. Martin, M. Nicolson, W. Rishell, J. A. Schultz, K. M. Semon, and R. G. Stewart, 1989. Replication defectivevectors of reticuloendotheliosis virus transducer exogenousgenes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo. *J. Virol.* 63:2680-2689.
- Dupuy, V., B. Nersessian and M. R. Bakst. 2002. Embryo Development from fests Cleavage Throught Seventy- Two Hours Incubation in Two Strains of Pekin Duck

- (*Anas platyrhynchos*). *Poultry Sci.* 81 : 860-868.
- Eyal-Giladi, H. 1991. The early embryonic development of the chick , as an epigenetic process. *Poult . Sci.* 3 : 143-166.
- Pettite, J. N., M. E. Clark, G. Liu, A. M. Verrinder Gibbins and R. J. Etches, 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells.
- Smith, T., W. 1997. The Development of the chick. Extension Service of Mississippi State University, cooperating with U. S. Department of Agriculture Publication 1150.
- Thoraval, P., M. Afanassieff, F. L. Cosset, F. Lasserre, G. Vergier, F. Coudert, and G. Dambrine, 1995. Germline transmission of exogenous genes in chickens using helper-free ecotropic avian leukosis virus-based vectors. *Transgenic Res.* 4 : 369-376.