

PEMANFAATAN TEKNOLOGI KLONING HEWAN UNTUK KONSERVASI SUMBER GENETIK TERNAK LOKAL MELALUI REALISASI BANK SEL SOMATIS

Oleh:

Gatot Ciptadi

Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya,

ABSTRAK

Embrio rekonstruksi hasil transfer nukleus donor sel somatik mempunyai manfaat yang sangat besar untuk riset dan implementasinya di bidang kedokteran, produksi ternak dan konservasi hewan langka. Adanya kecenderungan tingkat keberhasilan produksi hewan kloning yang lahir dan hidup normal pada berbagai spesies, membuka peluang dan harapan yang sangat besar bahwa teknologi ini berpotensi bagi konservasi plasma nutfah dari berbagai spesies. Semenjak kelahiran domba kloning pertama hasil transfer nukleus dengan sel somatik, maka kemudian disusul berbagai keberhasilan lahirnya hewan kloning berbagai spesies seperti, kambing, sapi, babi, tikus dll. Berbagai sel somatik yang telah menghasilkan individu kloning, diantaranya adalah sel kumulus, fetal/adult fibroblast, *mammary gland*, epitel dll. Sukses pertama kloning hewan langka adalah lahirnya Gaurs hasil transfer sel somatik gaur (*B. gaurus*) yang ditransfer interspesies pada oosit enukleasi sapi (*B. taurus*). Viabilitas sel somatic hasil kultur konfluen sangat tinggi berkisar antara 85 – 95 %. Konsep *genome resources bank* perlu mulai dicobakan pada populasi hewan liar, spesies langka dan juga ternak lokal. Dengan demikian, jika selama ini hanya dikenal dua macam sel yaitu spermatozoa dan oosit yang bisa dikriopreservasi, maka kedepan ada potensi yang sangat besar dengan realisasi banks sel somatik berbagai spesies hewan sebagai sumber sel donor untuk memproduksi individu kloning.

Kata kunci: Somatic cells, genetic diversity, nuclear transfer, cloning,.

ABSTRACT

Embryo cloning production using somatic cells donor has great potential application in medicine, animal production as well as preserving endangered and rare animal. Recent increased success of reproductive technologies has caused dramatic surge hope for preservation of endangered species. Since the birth of Dolly, the first sheep cloned from adult somatic cells, cloning adult animals has succeeded in several species including cattle, mice, pigs and goat. There are many somatic cells donor resources using fetal fibroblast, adult mammary gland cells, cumulus cells that indicate successful donor cell production for nuclear transfer. The first succesful cloning of an endangered animal cross-species nuclear transfer that give birth a baby

gaur bull. The concepts of genome resource banks and reproductive technology is important to re-introduced into wild animal population, rare and endangered animal and also local domestic animals. In the near future somatic bank cells has a great potential for genetic resources cryopreservation .

Key Words: Genetic diversity, nuclear transfer, cloning, somatic cells.

PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu genetika modern dan biologi molekuler telah memungkinkan isolasi dan manipulasi gen-gen terseleksi yang tidak diragukan lagi akan dapat mempercepat modifikasi-modifikasi genetik pada berbagai spesies hewan dan ternak. Pada masa yang akan datang potensi produksi embrio ternak hasil kloning melalui rekayasa transfer nukleus (TN) sangat besar, terutama jika dikaitkan dengan manipulasi genetik untuk menghasilkan individu hewan yang spesifik misalnya untuk tujuan produksi biofarmasi, perbaikan karakter produksi ternak, resistensi terhadap penyakit dll, dengan hanya memerlukan waktu satu generasi.

Perkembangbiakan ternak-ternak superior banyak bergeser dari perkawinan alam kearah rekayasa reproduksi mulai dari inseminasi buatan (IB), transfer embrio (TE), *in vitro* fertilisasi (IVF) dan yang terakhir kloning hewan dan ternak. Pada rekayasa kloning dengan TN, sel donor nukleus baik berupa sel embrionik maupun sel somatik telah digunakan baik dalam bentuk segar dan beku. Konsep *genome resources bank* dan teknologi reproduksi dimana termasuk di dalamnya aplikasi inseminasi buatan,

embrio transfer dan *in vitro* fertilization telah mulai dicobakan pada populasi hewan liar pada sekitar tahun 1990. Perkembangan terakhir dengan tingkat keberhasilan teknologi reproduksi yang makin baik menyebabkan suatu harapan yang sangat besar bagi preservasi spesies-spesies hewan langka. Keberhasilan yang pertama dari penggunaan teknologi kloning pada hewan langka adalah laporan keberhasilan lahirnya gaur jantan (*B.gaurus*) yang merupakan hasil transfer nukleus interspesies sel somatik gaur pada oosit sapi (*B. taurus*) yang kemudian ditransfer kedalam induk resipien sapi domestik pada akhir Nopember 2000.

Produksi embrio rekonstruksi hasil secara *in vitro* menggunakan transfer nukleus mempunyai potensi yang sangat baik di masa datang dari aspek genetik dan ekonomi. Kloning dengan transfer nukleus pertama kali dilaporkan pada ternak domba dan kemudian juga berhasil dilakukan pada berbagai jenis ternak lainnya seperti sapi, babi, kelinci, kambing dll. (Prather *et al.*, 1987, Heyman and Renard, 1996).

Namun demikian, walaupun rekayasa reproduksi ini mengalami kemajuan yang sangat pesat, pada saat

ini efisiensi produksi embrio hasil rekonstruksi dengan transfer nukleus masih rendah, karena masih banyak faktor yang belum sepenuhnya dikuasai seperti kualitas oosit, metode kultur embrio kloning, tipe sel donor, atau perlunya sinkronisasi siklus sel donor-sitoplasma resipient (Kato and Tsunoda, 1992). Metode produksi embrio kloning menggunakan donor sel somatik pada berbagai spesies ternak berawal dari sukses dan lahirnya domba Dolly, hasil kloning embrio yang direkonstitusi menggunakan donor sel somatik *mammary gland* dan sel *epithel fetal fibroblast*

Aplikasi rekayasa produksi embrio kloning ini pada ternak lokal di Indonesia perlu dilakukan dengan pertimbangan utama : (1). sebagai metode alternatif atau sarana untuk konservasi *genetic resources* spesies hewan langka dan ternak lokal unggul sekaligus untuk mempercepat peningkatan kualitas genetik ternak lokal yang ada, (2). sebagai antisipasi terhadap era pasar bebas dengan kemungkinan ekspor dan impor embrio ternak hasil kloning , dan (3). sebagai data genetik dampak aplikasi kloning pada ternak lokal di Indonesia di masa datang. (Ciptadi, 2005).

Konservasi plasma nutfah dalam bentuk sel donor dari sel somatis umumnya dilakukan pada *stock cells* (*cell banking*) untuk preservasi karakter tertentu yang diinginkan dalam bentuk sel beku dalam nitrogen cair (- 196°C) . Menurut Martin (1994), preservasi sel dengan daya *survival* terbaik, jika

dilakukan pada *fase subconfluent* (pertengahan sampai dengan *log-phase growth*) dan dipindahkan dalam medium kultur yang baru 24 – 28 jam sebelum dilakukan pembekuan.

Permasalahan utama yang ada pada teknologi TN adalah masih rendahnya tingkat keberhasilan anak yang lahir dari embrio hasil kloning, dimana rata-rata masih dibawah 3 % (Yu, 2003), meskipun perkembangan embrio mencapai fase blastosit telah mencapai lebih dari 50 % (Ongeri *et.al.*, 2001). Dengan demikian sebenarnya teknologi produksi embrio kloning tidak ada masalah lagi sehingga memungkinkan konservasi material genetik dalam jumlah besar dalam bentuk embrio beku yang setiap saat bisa ditransferkan pada resipient.

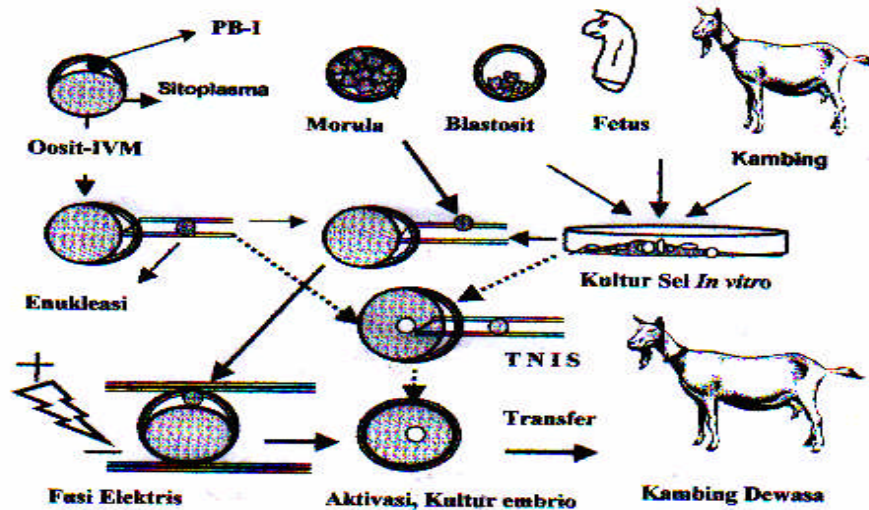
METODE KLONING TRANSFER NUKLEUS (TN)

Pelaksanaan kegiatan penelitian transfer nukleus meliputi serangkaian persiapan produksi sel donor dan sel resipien, transfer nukleus dan kultur embrio hasil rekonstruksi. Kloning menggunakan donor sel somatis mempunyai potensi yang sangat bagus baik pada tingkat riset maupun aplikasi di bidang peternakan, kedokteran dan konservasi plasma nutfah hewan dan ternak. Semenjak keberhasilan kloning domba Dolly, maka ternak kloning yang lahir dan hidup normal telah dilaporkan pada berbagai spesies.

Metode umum produksi embrio kloning dengan berbagai kemungkinan sumber sel donor dan metode transfer

sel nukleus serta preparasi umum sel resipien untuk menghasilkan sel rekonstruksi disajikan pada gambar dibawah ini.(Gambar 1). Berdasarkan pada sumber sel donor, maka ada dua

sumber utama yaitu nukleus sel embrionik (morula dan blastosis) serta sel somatik dari fetus dan hewan dewasa.



Gambar 1. Prosedur umum produksi embrio kloning menggunakan berbagai sumber sel donor (Ciptadi, 2005)

Pada perkembangan terbaru telah memungkinkan adanya transfer nukleus interspesies, misalnya antara Bos gaur dan Bos banteng dengan Bos taurus. Dari berbagai riset telah dilaporkan bahwa sitoplasma oosit *bovine* dapat melakukan *reprogramming* nukleus dari spesies lain (Shi, *et al.* 2003). Lebih jauh dikatakan bahwa nukleus dari domba, babi, kera dan tikus menunjukkan adanya respon positif *reprogramming* awal setelah di transfer

ke sitoplasma *bovine*, berdasarkan terjadinya pembelahan dan perkembangan hingga terbentuknya blastosis sekitar 10 – 15 % hingga ada yang lahir hidup. Hasil ini memacu para peneliti untuk menggunakan model alternatif ini sebagai cara konservasi spesies langka mamalia. Keberhasilan rekayasa TN tersebut dilakukan dengan menggunakan masing-masing jenis sel donor somatik fibroblast Bos gaur, fetal fibroblas kerbau, granulosa sel Ovis

orientalis musimon. Namun, saat sel donor nukleus sel somatik manusia ditransferkan pada sel oosit enukleasi, hanya 6 dari 56 sel rekonstruksi yang mampu berkembang menjadi 4 – 16 sel. Diduga masih ada inkomptabilitas yang tinggi antara komponen sel donor dan sitoplasma dengan makin jauhnya jarak antara spesies.

PENGGUNAAN SEL SOMATIK

Penggunaan sel somatik pada transfer nukleus pada sapi menghasilkan tingkat fusi nukleus-sitoplasma sekitar 50 – 80% (Goto et.al, 1999). Penggunaan MGE menghasilkan 56 ± 7 % terjadi fusi, dimana 85 % mengalami *cleavage* dan 35 % mencapai fase blastosit (Kishi et.al, 2000). Hasil lain justru diperoleh tingkat fusi sekitar 69 % dengan menggunakan *mammary gland cells* yang diperoleh dari rumah potong hewan, bukan dari kolostrum (Goto et.al. 1999).

Semenjak Wilmot pada tahun 1987 mempublikasikan keberhasilannya dengan lahirnya domba hasil transfer nukleus menggunakan sel *mammary glands (MG)* dan sel *fetal fibroblast*, beberapa penelitian akhirnya juga berhasil memproduksi ternak klonning dengan menggunakan sel somatis yang lain seperti sel kumulus, sel oviduct, sel granuloosa, jaringan otot *longissimus thoracis* atau sel fibroblast pada mencit, sapi dan kambing (Shiga et.al, 1999, Baguisi et.al., 1999, Cibelli et al, 1998). Sementara itu penggunaan susu kolostrum-Mammary Glands Cells-

Epithel (MGE) sebagai sumber sel donor (sel epithel) pertama kali dilaporkan oleh Kishi et.al. (2000) karena cara memperolehnya yang relatif lebih mudah.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa penggunaan sel somatik sebagai donor embrio rekonstitusi menghasilkan tingkat kematian embrio dini (*pregnancy lost*), perkembangan yang abnormal termasuk didalamnya berat lahir yang tinggi dan abnormalitas placenta (Garry et.,al, 1996, Hill et.al., 1999; Kishi et.al, 2000) dan hal ini diduga terkait dengan masalah-masalah kekurangan sempurnaan protokol transfer nukleus itu sendiri. Lebih lanjut dikatakan, ketidak sempurnaan reprogramming kultur donor sel, atau kekurangan dalam IVM dan kultur sistem embrio yang digunakan. Semua kekurangan ini selanjutnya diduga akan menyebabkan pola yang kurang sesuai dari ekspresi gen pada fase-fase pembentukan embrio, perkembangan fetus dan placenta, sehingga akhirnya juga berpengaruh pada kematian mebrrio dini atau gagalnya kebuntingan ternak.

Protokol produksi sel donor, misalnya Sel MGE, diperoleh dari kolostrum kambing yang baru melahirkan dalam 48 jam, dilakukan koleksi dalam botol steril dan disimpan dalam 4 °C hingga 5 jam, diencerkan dalam DPBS (GIBCO) dengan perbandingan 1:1, disentrifugasi 500 g selama 5 menit pada temperatur 4 °C . Sel-sel yang mengendap kemudian diencerkan kembali dalam 50 ml DPBS dan disentrifugasi lagi dan diulang

hingga 3 kali . Sel-sel hasil prisiptitasi siap dikultur sebagai donor sel dalam medium DMEM (Gibco) yang disuplementasi dengan 15 % FCS, 2500 IU/ml pennicilim (Meiji), 10 mg/ml streptomycin, 25 ug/ml fungizone (Gibco) dalam konsentrasi tinggi antibiotik dalam DMEM (Kishi *et al*, 2000). Sementara itu sel kumulus diperoleh setelah melakukan kultur kumulus oosit kompleks dalam medium yang disuplementasi dengan 20 % FBS.

Setelah 18 – 20 jam IVM dilakukan separasi dengan 0.1 % hyaluronidase (Sigma) dan siap dikultur sebagai donor sel (Nour *et al.*, 2000).

Uji viabilitas sel donor setelah dilakukan 2 - sub culture dalam kondisi konfluen beberapa jenis sel somatik, disajikan pada Tabel 1. (Ciptadi dkk., 2003). Uji viabilitas dilakukan dengan staining sel dengan H33258-PI menggunakan mikroskop epifluorescent.

Tabel 1. Viabilitas sel somatik hasil kultur konfluen dari ternak kambing

No.	Jenis sel	Estimasi viabilitas (%)
1.	Sel kumulus dan sel granulosa (sub kultur 2)	95.0 ± 2.10
2.	Fibroblast ear (dewasa, sub kultur 2)	90.0 ± 4.2
3.	Fetal fibroblast (sub kultur 3)	85.3 ± 5.6

Menurut Kishi *et.al.*,(2000) sel-sel donor hasil kultur *in vitro* baru dapat digunakan sebagai donor setelah 2 – 7 kali *passages*. Sel diinduksi untuk memasuki fase “*quiescent*” dengan *serum starvation*. Metodenya ditempuh dengan pengurangan kadar FCS dalam medium dari 10 % menjadi 0.5 % sampai 1.0 % (v/v) dan sel dikultur selama 6 – 7 hari. Sebelum dilakukan starvasi sel donor somatis (MGE dan fibroblast) masing-masing dikultur selama 7 dan 10 hari. Suspensi *singgle-cells* dipersiapkan dengan melakukan tripsinasi sebelum dilakukan transfer nukleus, dimana sell di larutkan kembali dalam TALP-HEPES yang disuplementasi dengan 1 % FCS.

PREPARASI SEL RESIPIEN

Sel resipien yang digunakan adalah oosit matang (M-II) baik yang diperoleh dari pemanenan *in vivo* maupun hasil maturasi *in vitro*. Oosit ini sebelumnya dilakukan enukleasi atau pengambilan inti sebelum bisa digunakan sebagai oosit resipien.

Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan dalam medium kultur TCM 199 dengan suplemantasi hormon gonadotrophin dan serum dalam inkubator 5 % CO₂, temperatur 39° C dengan kelembaban maksimum dalam drop 50 ul/10 COC yang dilapisi mineral oil. Sel-sel kumulus dilepaskan dengan melakukan pemaparan sel oosit

dalam 1 mg/ml hyaluronidase (Sigma) dalam DPBS (Gibco) selama 10 menit dan dibantu dengan vortex atau melakukan pemipetan secara manual (Tanaka, 2001; Ciptadi, dkk. 2000).

Oosit tanpa kumulus yang nampak polar tubuhnya kemudian ditempatkan dalam 5 ug/ml cytochalasin B (Sigma) dalam PBS yang disuplementasi dengan 10 % FCS (PBS-FCS) selama 5 – 10 menit sampai dilakukan enukleasi. E nukleasi oosit mature dilakukan dengan melakukan aspirasi sebagian kecil dari volume sitoplasma di dekat polar bodi dengan menggunakan micropipet. Untuk konfirmasi keberhasilan enukleasi oosit distaining dengan Hoechst 33342 (5 ug/ml dalam PBS-FCS) dan diperiksa sesingkat mungkin dalam beberapa detik dibawah mikroskop *epifluorescent* (Tanaka, 2001).

Menurut Keefer et al. (2001), enukleasi dapat dilakukan sebagai berikut : (1). Pada oosit yang di staining dengan Hoechst 33342 yang diikuti dengan pemaparan yang singkat dari sitoplasma pada sinar UV (Zeiss Filter Set 01) untuk melakukan determinasi lokasi dari kromosom. (2). Kemudian oosit dapat dimanipulasi pada temperatur kamar (24 – 26 °C) di medium penanganan oosit (MEM yang disuplementasi dengan 1 % FBS, tanpa penambahan *cytochalasin B* (3). Fase maturasi inti diamati dan dicatat selama proses enukleasi (4). Sitoplasma yang diambil dilakukan pengecekan adanya kromosom dan polar bodi dengan pemaparan dengan sinar UV.

PRODUKSI SEL REKONSTRUKSI HASIL TRANSFER NUKLEUS (TN)

Secara umum ada dua metode transfer nukleus yaitu: (1) nukleus di transfer dalam ruang periviteli dan selanjutnya dilakukan fusi dan aktivasi sel rekonstruksi , (2). Transfer nukleus langsung ke sitolasma dan kemudian dilakukan aktivasi sel rekonstruksi. Aktinasi sel rekonstruksi bisa dilakukan dengan beberapa cara yaitu secara elektris, fisik dan dan penggunaan beberapa bahan aktivator kimia atau kombinasi dari keduanya (Ciptadi, 2005).

Setelah nukleus ditransfer ke dalam sitoplasma oosit enukleasi maka protein dalam nukleus akan mengalami migrasi ke dalam sitoplasma, demikian juga sebaliknya protein dalam sitoplasma masuk ke dalam nukleus. Pertukaran protein ini akan menghasilkan rekonfigurasi struktur dari nukleus dimana sintesa RNA berubah. Jika nukleus mengalami *reprogramming* secara benar, maka hal itu akan merupakan langkah awal perkembangan dan pengulangan kembali kejadian-kejadian awal perkembangan embrio (Prather *et.al.*, 2000). Embrio yang diproduksi secara *in vitro* akan cenderung memproduksi RNA pada fase yang lebih awal, kemunculan sintesa RNA utama adalah tergantung masing-masing spesies, misalnya pada mencit mulai terjadi selama fase 2 sel; babi, manusia dan tikus pada 4 sel dan sapi dan domba terjadi pada 8 – 16 sel.

Jika nukleus mengalami *reprogramming*, 24 jam setelah nukleus ditransfer nukleus seharusnya memproduksi sangat sedikit RNA dan berperan dalam *cleavage* embryo menjadi 2 sel. Jika tidak terjadi *reprogramming* sel donor, nukleus akan mencoba mengembangkan ruang blastokol sementara embrio tetap hanya pada tahap 2 sel. Pada kondisi seperti ini maka embrio yang berkembang hanya merupakan bentuk *tropoctoderm* dan bukan *inner cell mass* (ICM) (Prather *et al.*, 1987).

Pada awal fase *cleavage* embryo terjadi perubahan-perubahan struktur kromatin. Perubahan-perubahan ini pada masing-masing spesies dapat dilihat secara umum dengan pengukuran perubahan di aspek-aspek tertentu pada struktur nukleus, diantaranya adalah perubahan pada ukuran, komposisi dan struktur itu sendiri. Setelah transfer nukleus, maka kejadian yang paling bisa diamati adalah perubahan dari ukuran nukleus (Prather *et al.*, 2000). Diameter pronukleus pada fase awal perkembangan embrio akan berkurang.

Aktivasi oosit mamalia berhenti pada metafase pada *second meiotic division* (MII) termasuk *exit* dari meiosis dan *re-entry* ke dalam *mitotic cell cycle*, dimana dihasilkan formasi pronukleus dan kemudian *cleavage* dan perkembangan embrio. Pada fertilisasi normal, fusi spermatozoa dan oosit adalah cukup untuk aktivasi, dengan adanya kenaikan ion *calcium intrasellulair*. *Sperm-induced activation* telah dilaporkan pada mencit, hamster,

babi dan Sapi serta kelinci (Reggio, 2002). Protokol yang dikembangkan untuk aktivasi buatan pada mamalia pada proses pengembangan parthenogenesis dimaksudkan untuk meniru kejadian-kejadian rangsangan biokimia dan fisik yang secara alamiah terjadi secara normal dalam interaksi spermatozoa-oosit.

Ongeri *et al.* (2001) dan Fulka *et al.* (2001) menyatakan bahwa untuk keberhasilan kloning mamalia masih perlu mencari protokol aktivasi oosit resipient yang lebih baik dan tergantung pada *reprogramming* transfer nukleus pada oosit enukleasi. Renard *et al.* (2002), mengatakan bahwa *remodeling* dari kromatin donor oleh sitoplasma resipient terjadi setelah dilakukan transfer nukleus. Pada transfer nukleus menggunakan sel somatik diperlukan aktivasi buatan untuk bisa melanjutkan perkembangan selnya. Menurut Choi *et al.* (2001) oosit rekonstitusi dengan nukleus yang mengalami pembesaran atau terjadi *cleavage* sehingga nukleus mengalami multiplikasi bisa dianggap sebagai oosit teraktivasi.

MANFAAT TEKNOLOGI KLONING DENGAN TN

Pada saat ini efisiensi produksi embrio hasil rekonstruksi dengan transfer nukleus masih rendah, karena masih banyak faktor yang belum sepenuhnya dikuasai seperti kualitas oosit, metode kultur embrio kloning, tipe sel donor, atau perlunya sinkronisasi siklus sel donor-sitoplasma resipient (Kato and Tsunoda, 1992).

Sementara disisi lain, teknologi transfer nukleus mempunyai peluang munculnya abnormalitas genetik dan fenotip dengan ditandai dengan berat lahir anak yang tinggi, panjangnya kebuntingan, distocia dan mortalitas postnatal yang tinggi (Yazawa et.al., 1997). Penelitian Yoshizawa *et.al* (1999) menunjukkan bahwa embrio sebanyak 43 % (81/185) adalah normal berdasarkan dari sel blastomernya dan 60.6 % (20/33) berdasarkan pada embrio hasil IVF. Menurut Westhusin *et.al* (2001) produksi ternak kloning sementara ini masih sangat tidak efisien dengan rata-rata kurang dari 10 persen embrio hasil kloning yang lahir hidup. Namun demikian, dengan adanya keberhasilan produksi ternak kloning pada berbagai spesies dan laboratorium di berbagai negara adalah sangat menarik dalam kaitannya dengan produksi ternak dengan genotip spesifik seperti yang diinginkan.

Jika efisiensi transfer nukleus telah dapat ditingkatkan maka kloning akan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kemajuan genetik yang jauh lebih besar dibandingkan dengan pemuliaan ternak konvensional. Selama ini dengan metode pemuliaan konvensional diketahui bahwa sebagian besar karakter produksi hewan dan ternak dikontrol oleh sejumlah besar gen. Dengan teknik kloning memungkinkan melakukan modifikasi performans dengan menggunakan single gen atau beberapa gen terbaik saja seperti misalnya untuk memperbaiki karakter pertumbuhan atau

efisiensi karakter-karakter tertentu sepanjang secara komersial masih bisa diterima.

Suksesnya aplikasi kloning pada nuklear transfer interspesies gaur-sapi menjanjikan suatu potensi yang sangat besar bagi penyelamatan spesies-spesies hewan langka dan hampir punah. Teknik kloning dengan demikian sangat memungkinkan menjadi suatu instrument bagi penyelamatan spesies-spesies hewan yang hampir punah dan juga memungkinkan untuk penyimpanan material genetik dari hewan-hewan tersebut dari yang ada sekarang ini. Russo (2002) menyatakan bahwa rekayasa reproduksi dapat digunakan untuk memaksimumkan potensi *genome resource banks* dimana memungkinkan hewan secara individual bereproduksi dan memberikan jaminan bagi terjaganya seks rasio diantara populasi yang ada. Inseminasi Buatan misalnya, telah banyak digunakan untuk program konservasi beberapa spesies hewan seperti cheetah, rusa, panda dan gajah asia.

Penyimpanan informasi atau materi genetik saja tidaklah cukup. Implementasi dari rekayasa reproduksi (Inseminasi Buatan, Transfer embrio, IVF dan kloning) adalah sangat penting untuk mulai dilakukan untuk merealisasi pengembangan *genome resource banks*.

KESIMPULAN

Perkembangan yang sangat pesat teknologi reproduksi dan hasil riset kloning hewan dan ternak saat ini akan

mempunyai dampak nyata dan positif pada pengembangan riset-riset ilmu dasar, kedokteran dan farmasi serta bidang produksi ternak. Salah satu keuntungan nyata dari teknologi ini adalah dapat digunakannya untuk mengimplementasikan *genome resource banks* yang sangat bermanfaat bagi upaya pelestarian diversitas genetik spesies hewan langka ataupun mempercepat peningkatan kualitas genetik ternak unggul.

PUSTAKA ACUAN

- Anonimous, 2000. Cloning: bringing Back Endangered Species. www.findarticle.com/cf_O/mODED/3_21.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrepes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. 1999. Production of Goats by somatic cell nuclear transfer. *J. of Nature Biotechnology* 1999; 17:456 – 461.
- Choi, Y.H., Shin T. Love, C.C., Varner, D.D., Burghardt , R.C., and K. Hinrichs, K. 2001. Effect of Initial Cumulus Morphology and Addition of Cytochalasin B on Fusion, Activation and Cleavage of Horse Oocytes Undergoing Nuclear Transfer. *Theriogenology*. Abstract. Proc. The Animal Conference International Embryo Transfer Soc. Nebraska USA, 13 – 16 January. 2001.
- Cibelli JB, Stice SL., Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J., Balackwell C, Ponce de Leon FA, Rpb1 JM, 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *J. of Science* 1998; 280 : 1256 – 1258.
- Ciptadi, G. Sri Wahjuningsih, N. Isnaini , M.S. Djati dan Suyadi. 2000. Evaluasi in vitro maturasi dan viabilitas oosit post thawing menggunakan Hoescht 33258 setelah penghilangan krioprotektan. *Jurnal Agritek* Vo. 8 Nomer.3 Juli 2000.
- Ciptadi,G. 2005. Pengembangan metode aktivasi oosit rekonstruksi hasil transfer nukleus intra sitoplasma untuk produksi embrio kloning kambing. Ringkasan disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya Malang. 1 – 49.
- Ciptadi, G. A. oediono, dan MS. Djati. 2003. Strategi Kreasi dan konservasi bibit kambing lpkal unggul melalui produksi embrio kloning hasil rekonstitusi dengan transfer inti. Laporan Penelitian RUT-Menristek, Jakarta. 1- 13.
- Fulka, J. Jr. , Loi P, Ledda S, Moor R.M. and Fulka J. 2001. Nuclear transfer in mammals: how the oocyte cytoplasm modifies the transferred nucleus. *J. Theriogenology*, Vol 55 (6) : 1373 – 1380.
- Garry FB., Adams R, McCann JP, Odde KG. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear

- transfer cloning. *J. Theriogenology* 1996; 45: 141 – 152.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-Noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S, Nakane S. 1999. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells on a dairy cow (Rapid communication) *J. Anim . Sci.* 1999; 70: 243 – 245.
- Heyman, Y and Renard , J.P. 1996. Cloning domestic species. *Anim. Reprod. Sci.* 42 , pp 427 – 436.
- Hill JR., Roussel AJ, Cibelli JB., Edward JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robls JM Stice SL. 1999. Clinical and pathologicac features of cloned transgenic calves and fetuse (13 case studies). *J. Theriogenology* 199; 51: 1451 – 1465.
- Kato Y and Y Tsunoda. 1992. Synchronous division of mouse two-cell embryos with nocodazole in vitro. *J. Repeod, Fert.* (1992) 95 : 39 – 43.
- Keefer , C.L., H. Baldasarre, R. Kayston ., B. Wang, B. Bathia, AS. Bilodeau, J.F. Zhou, M. Leduc , B.R., Downwy, A. Lazaris and C.N. Karatzas. 2001. Generation of Dwarf Goat (*Capra hircus*) Clones Following Nuclear Transfer with Transfected and NonTransfected Fetal Fibroblast and In Vitro-Matured Oocytes. *J. of Biology of Reproduction* 64, 849 – 856.
- Kishi M., Itagaki Y, Takakura R., Imamura M., Sudo, T. Yoshinari M, Tanimoto M., Yasue M., Kashima N. 2000. Nuclear Transfer in Cattle using colostrum-derived mammary Gland Epithelial cells and Erat-Derived Fibroblast cells. *J. Theriogenology* 54(5): 675 – 684.
- Lohuis, MM. 1995. Potentials benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43, pp. 51 – 60.
- Martin, B.M, 1994. *Tissue Culture Techniques. An Introduction.* Birkhauser, Boston, Basel, Berlin
- Nour, M.S.M., K. Ikeda and Y. Takahashi. 2000. Bovine Nuclear Transfer Using Cumulus Cells Derived from Serum-Starved and Confluent Cultures. *Journal of Reproduction and Developemnt*, Vol. 46 , No. 2, 2000.
- Ongeri, EM., C.L. Bormann, R.E. Butler, D. Melican, W.G. Gavin, Y. Echelard, R.L. Krisher and E. Betboodi. 2001. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different method. *J. Theriogenology* Vo. 55 (9): 1933 – 1945.
- Prather, R.S. Barner, F.L. Sims, M.L. Robl, J.M., Eyestone, W.H., and First, N.L. 1987. Nuclear Transplantation in the bovine embryo: assesment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology Reproduction*, 37, 859 – 866.
- Prather , R.S., Kuhholzer, B., Lai, L., and Park, K.W. 2000. Changes in

- the Structure of Nuclei after Transfer to Oocytes. Cloning Volume 2 Number 3, 2000. Mary Ann Liebert, Inc.
- Reggio, B. 2002. Production of Transgenic Goat by Somatic cell nuclear transfer. Dissertation. LSU Univ. USA.
- Renard, J.P., Qi Zhou, D. LeBourhis, P. Chavate-Palmer, L. Hue, Y Heyman and X. Vignon. 2002. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *J. Theriogenology* Vol 57 (1): 203 – 222.
- Russo, R. 2002. Technological Intervention: A Strategy for Endangered Species, Texas A & M University Undergraduate Journal Science, Vol 3, Issue No.1. Fall 2001/Spring 2002.
- Shiga, K., Fujita T, Hirose K, Sasae Y and Nagai T. 1999. Production of Calves by Transfer of Nuclei From Cultured Somatic Cells Obtained From Japanese Black Bull. *J. Theriogenology* 52: 527 – 535, 1999.
- Renard, J.P., Qi Zhou, D. LeBourhis, P. Chavate-Palmer, L. Hue, Y Heyman and X. Vignon. 2002. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *J. Theriogenology* Vol 57 (1): 203 – 222.
- Shi. W., V. Zakhartchenko and E. Wolf. 2003. Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* (2003 71: 91 – 113.
- Smith, C. 1989. Cloning and genetic improvement of beef cattle. *Anim. Prod.* 49, pp. 163 – 169.
- Tanaka, H. 2001. Reproductive Biology and Biotechnology. JICA, Japan International Cooperation Agency, Indonesia (2001).
- Westhusin, M.E., C.R. Long, T. Shin, J.R. Hill, C.R. Looney, J.H. Pryor and J.A. Piedrahita. 2001. Cloning to reproduce desired genotypes. *J. Theriogenology*, Vo. 55 (1): 35 – 49.
- Willadsen, S.M. and Polge, C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108. pp, 211-213.
- Yazawa, S., Y Aoyagi, M. Konishi, T. Takedomi. 1997. Characterization and cytogenetic analysis of Japanese Black Calves produced by nuclear transfer. *J. Theriogenology* 48: 641 – 650.
- Yoshizawa, M., Konno H, Zhu S, Kageyama S, Fukui E., Muramatsu S, Kim S and Araki Y. 1999. Chromosomal Diagnosis in Each Individual Blastomere of 5 – 10 cell Bovine Embryo derived from In vitro Fertilization. *J. Theriogenology* 51 : 1239 – 1250.
- Yu, Y.S., X.S Sun, H. N. Jiang, Y. Han, C.B. Zhao and J.H. Tan. 2003. Studies of the cell cycles of in vitro cultured skin fibroblast in goat: Work in progress. *J. Theriogenology*, Volume 59, Issues 5-6, March 2003 Pages 1277 – 1289.

